



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

**“Cambios en la estructura y las propiedades fisicoquímicas
de frutos de arándano por aplicación de factores emergentes
de conservación”**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial

Gabriela Maribel Jaramillo Sánchez

Directora: Dra. Andrea Nieto

Directora Asistente: Dra. Analía B. García Loredó

Consejera de estudios: Dra. Marcela Tolaba

Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Fecha de defensa: 13 de marzo de 2019.

Cambios en la estructura y las propiedades fisicoquímicas de frutos de arándano por la aplicación de factores emergentes de conservación

Se evaluó la eficiencia de la aplicación de diferentes dosis de ozono en fase acuosa y/o luz ultravioleta de onda corta, aplicados en forma individual o en combinación, como tecnologías de conservación de procesamiento mínimo, en frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

Los tratamientos de ozono disminuyeron significativamente el crecimiento de la micobiota nativa y *Botrytis cinerea*. Los cambios provocados por el ozono en las propiedades mecánicas y el color fueron mínimos pero el porcentaje de pérdida de peso durante el almacenamiento se incrementó significativamente, principalmente a las mayores dosis. Los frutos ozonizados presentaron el epicarpo levemente afectado, observándose compactación tangencial, disrupciones de la pared tangencial externa y un ligero incremento en los espacios intracelulares. El ozono provocó un aumento significativo en los compuestos bioactivos evaluados.

En los frutos irradiados con luz UV-C se observó una reducción en el crecimiento de la micobiota nativa y de *Botrytis cinerea*. En general no se observaron mayores modificaciones en las propiedades mecánicas en el almacenamiento y se encontraron cambios en el color en relación al control. El tratamiento provocó pérdidas de peso significativas. Las alteraciones estructurales por efecto de luz UV-C fueron menores. La luz UV-C no indujo cambios significativos en los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante respecto del control.

Los tratamientos combinados no produjeron un aumento significativo en la inhibición de la micobiota nativa y de *Botrytis cinerea* inoculado en los frutos respecto a los tratamientos individuales, ni una mejora en los parámetros de calidad evaluados.

Ambos factores emergentes, aplicados en forma individual como pretratamientos al almacenamiento refrigerado, son alternativas para incrementar la vida útil de arándanos sin alterar apreciablemente su calidad. Más aún, los frutos ozonizados mostraron un incremento en el contenido de componentes bioactivos.

Palabras claves: arándano, ozono, luz UV-C, micobiota nativa, *Botrytis cinerea*, calidad, propiedades mecánicas y ópticas, compuestos bioactivos, estructura.

Changes in structure and physical-chemical properties of blueberry fruit due to emerging preservation factors

The efficiency of different ozone (in aqueous phase) and UV-C irradiation doses, applied as single factors or in combination, as minimal processing techniques for blueberry fruits (*Vaccinium corymbosum* L.) preservation was assessed.

Ozone treatments significantly decreased growth of both, native mycobiota and *Botrytis cinerea* conidia during refrigerated storage. Small changes in mechanical and optical properties were induced by ozone but weight losses significantly increased along storage, mainly at the highest ozone concentrations and exposure times. Ozonized fruits showed a slightly affected epicarp, with tangential contraction, external tangential wall disruptions, and increased intracellular spaces between epidermal and sub epidermal layers. A significant increase in evaluated bioactive compounds (anthocyanins and total phenols) and in the antioxidant capacity was detected in treated fruit.

A decrease in native mycobiota and *Botrytis cinerea* development was also observed when blueberries were irradiated with UV-C light. In general, little changes were observed in mechanical properties but significant alterations were found in colorimetric parameters and functions when comparing to untreated fruits. Weight losses were significant and increased during storage. Structural alterations caused by UV-C light were minor. UV-C light did not induce significant changes in bioactive compounds and antioxidant capacity when compared to control samples.

Combined treatments did not result in any significant increase in native mycobiota and *Botrytis cinerea* inhibition in blueberries when contrasting to single treatments, nor an improvement in the evaluated quality attributes was observed.

Both, ozone and UV-C light, applied as single factors before refrigerated storage, are alternatives to increase blueberry postharvest shelf life without a severe impact on fruit quality. Moreover, ozone application increased bioactive compounds content and antioxidant capacity.

Keywords: blueberry, ozone, UV-C light, native mycobiota, *Botrytis cinerea*, quality, mechanical and optical properties, bioactive compounds, structure

Agradecimientos

A Dios, por su amor infinito, por su fidelidad, por su promesa de eterna y guiarme en todo momento.

A Andrea y Analía por sus enseñanzas, por haberme dirigido durante todo este tiempo, por su apoyo y dedicación para llevar a cabo esta investigación.

A Stella por su aporte en el diseño experimental, por tomarse todo el tiempo necesario para contribuir con la corrección de esta tesis, por compartir sus conocimientos y por siempre estar dispuesta a darme un consejo, una solución y más allá de lo profesional, *por siempre estar.*

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad de Buenos Aires, el SENESCYT por el aporte financiero brindando para la realización de esta tesis.

A Paula, por su compañerismo e impulsarme a salir adelante, por su aporte y orientación en todo lo referente a la determinación de compuestos bioactivos.

A Silvia, Lucas por su apoyo profesional, aporte y orientación respecto a los estudios de microbiología y por estar siempre dispuestos a darme una mano en lo que necesité.

A Marilín por su colaboración con todo lo relacionado a microscopía óptica.

Por el apoyo incondicional de Julio y Daniel en la reparación de los equipos

A la Contisita, Dieguito, Alondrita por ser más que compañeros, ser los amigos y familia del diario vivir con quien compartimos muchas aventuras, alegrías y gratos momentos.

A mis compañeros Angeluos, Solcito, Berni, Mariana, Mechi, Marce, Daniela.

A mi esposo Diego por su incondicional amor, compañía, apoyo y estar en todo momento enseñándome a confiar en Dios.

A mi mamita y hermanos Patricio, Leonardo, David, Carmita y Monabell por su infinito cariño y apoyo a pesar de la distancia.

A ti Lú por ser esa compañera y amiga que sin interés alguno siempre esta.

A Jhonci, Pablosky, Nachito, Edu, Carlitos y Ro por ser esos amigos con los que me puedo olvidar del ámbito académico y simplemente reírnos de las ocurrencias de cada uno.

A Juli, Shyr, Nick, Linda y Vick por ser mi sostén espiritual, mi apoyo incondicional.

A todos quienes han sido parte de este sueño y de una u otra manera formaron parte de él.

Gaby

A mi esposo
A mi mamita
A mis hermanos

1.	OBJETIVOS	1
1.1	Objetivo general	3
1.2	Objetivos específicos	3
2.	INTRODUCCIÓN	4
2.1	NUEVAS TECNOLOGÍAS DE DESCONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS	5
2.1.1	El Ozono	6
2.1.1.1	Factores que influyen en la eficacia del tratamiento con ozono	7
2.1.1.2	Efecto del ozono sobre los microorganismos	8
2.1.1.3	Uso del ozono en la industria de alimentos	9
2.1.1.4	Uso del ozono en la desinfección de frutas	10
2.1.1.5	Efectos del ozono en la calidad de las frutas	11
2.1.2	Luz ultravioleta de onda corta (UV-C)	11
2.1.2.1	Naturaleza de la luz UV	12
2.1.2.2	Efecto sobre los microorganismos	16
2.1.2.3	Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C	18
2.1.2.4	Aplicaciones de la luz UV-C en alimentos	18
2.1.3	Combinación de tecnologías para descontaminación de alimentos	20
2.2	EL ARÁNDANO	21
2.2.1	Características botánicas del arándano	24
2.2.2	Consideraciones anatómicas de los frutos (bayas)	26
2.2.2.1	Descripción anatómica del epicarpo	27
2.2.2.2	Pared tangencial externa de las células epidérmicas	27
2.2.3	Requerimientos ecológicos del cultivo de arándano (breve mención)	31
2.2.4	Manejo cosecha y poscosecha del arándano	33
2.2.5	Incidencia de pudrición del arándano	37
2.3	ATRIBUTOS DE CALIDAD EN LOS ALIMENTOS	38
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1	Materia prima	44
3.2	Reactivos y medios de cultivo empleados	45
3.3	Descontaminación de frutos con ozono en fase acuosa	46
3.3.1.	Descripción del equipo	46
3.3.2	Determinación de la concentración de ozono en la fase acuosa	47
3.3.3	Concentración de ozono y tiempos de exposición	48
3.4.	Descontaminación de frutos con luz UV-C	49
3.4.1	Descripción del equipo	49
3.4.2	Determinación de la intensidad de radiación UV-C	49
3.4.3	Dosis de radiación UV-C	50

3.5 Descontaminación de frutos por combinación de tratamientos con ozono en fase acuosa y luz UV-C.	50
3.6 Almacenamiento de los frutos sujetos a tratamientos de descontaminación.....	50
3.7 Estudios sobre el desarrollo microbiano en los frutos de arándano	51
3.7.1 Evaluación del desarrollo de la micobiota nativa (mohos).....	51
3.7.2 Evaluación del desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i>	52
3.8 Evaluación de parámetros de calidad	53
3.8.1 Determinación de pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad.....	53
3.8.2 Medición de las propiedades mecánicas.....	54
3.8.3 Determinación de la pérdida de peso.....	56
3.8.4 Evaluación de los parámetros y funciones colorimétricas.....	56
3.9 Evaluación de compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante del arándano.	59
3.9.1 Extracción de los compuestos bioactivos	59
3.9.2 Medición del contenido de antocianinas	60
3.9.3 Medición de los compuestos fenólicos	60
3.9.4 Determinación de la capacidad antioxidante	61
3.10 Observación de la micro y ultraestructura	64
3.10.1 Microscopía óptica	64
3.10.2 Microscopía electrónica ambiental de barrido.....	65
3.11 Análisis estadístico de los datos	65
4. RESULTADOS	68
4.1 APLICACIÓN DE OZONO EN FASE ACUOSA	69
4.1.1 Determinación de la concentración de ozono en la fase acuosa.....	69
4.1.2 Evaluación de la respuesta microbiana.....	70
4.1.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa.....	70
4.1.2.2 Desarrollo de <i>B. cinerea</i>	74
4.1.3 Estudio de la estructura	82
4.1.3.1 Observación de la microestructura	83
4.1.3.2 Observación de la ultraestructura	91
4.1.4 Evaluación de los parámetros de calidad.....	98
4.1.4.1 pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad	98
4.1.4.2 Propiedades mecánicas	100
4.1.4.3 Pérdida de peso	109
4.1.4.4 Parámetros y funciones colorimétricas.....	112
4.1.5 Compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante.....	115

4.1.5.1 Puesta a punto de la técnica de extracción: selección del solvente de extracción, tiempo de extracción y porcentaje de acidificación del solvente en la extracción.....	115
4.1.5.2 Contenido de antocianinas.....	118
4.1.5.3 Contenido de fenoles totales.....	119
4.1.5.4 Capacidad antioxidante	122
4.1.6 Aportes e integración de los resultados	129
4.2 APLICACIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA.....	132
4.2.1 Selección de las dosis de radiación UV-C.....	132
4.2.2 Evaluación de la respuesta microbiológica	132
4.2.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa.....	132
4.2.2.2 Desarrollo de <i>B. cinerea</i>	135
4.2.3. Estudio de la estructura	139
4.2.3.1 Observación de la microestructura	139
4.2.3.2 Observación de la ultraestructura	145
4.2.4 Evaluación de parámetros de calidad	151
4.2.4.1 pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad.	151
4.2.4.2 Propiedades mecánicas	153
4.2.4.3 Pérdida de peso.....	161
4.2.4.4 Parámetros y funciones colorimétricas.....	163
4.2.5 Compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante.....	167
4.2.5.1 Contenido de antocianinas.....	167
4.2.5.2 Contenido de fenoles totales.....	169
4.2.5.3 Capacidad antioxidante	171
4.2.6 Aportes e integración de resultados.....	176
4.3 APLICACIÓN DE OZONO Y RADIACIÓN UV-C EN COMBINACIÓN.....	178
4.3.1 Selección de tratamientos con ozono y radiación UV- C.....	178
4.3.2 Evaluación de la respuesta microbiológica	178
4.3.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa.....	178
4.3.2.2 Desarrollo de <i>B. cinerea</i>	181
4.3.3 Estudio de la estructura	184
4.3.3.1 Observación de la microestructura	184
4.3.3.2 Observación de la ultraestructura	189
4.3.4 Evaluación de parámetros de calidad	195
4.3.4.1 Medición de las propiedades mecánicas.....	195
4.3.5.2 Pérdida de peso.....	201
4.3.5.3 Parámetros y funciones colorimétricas.....	203

4.3.6 Aportes e integración de resultados.....	205
5. CONCLUSIONES.....	207
6. BIBLIOGRAFÍA	212



1. OBJETIVOS

El arándano es una de las bayas más populares actualmente entre los consumidores debido a su aspecto y sabor atractivos y los beneficios que aportan a la salud humana muchos de sus compuestos, tales como antocianinas, flavonoides, ácido ascórbico y polifenoles (Fava y col., 2006).

Los frutos de arándano se consumen tradicionalmente al estado fresco y también se utilizan para elaborar mermeladas, muffins, pasteles, yogures y otros.

Los principales cultivares en Argentina son O'Neal y Misty, siendo el cultivar O'Neal el predominante en la provincia de Buenos Aires. El noventa y cinco por ciento de la producción argentina se exporta como fruta fresca, principalmente a Estados Unidos, Reino Unido, Europa Continental y una proporción menor a Asia y Canadá (ABC; SENASA; Greco y col., 2012). Debido a la contra estacionalidad, la exportación de arándanos es rentable; la cosecha comienza en noviembre justo cuando en el hemisferio norte hay falta de frutos frescos debido a que se encuentran en estación invernal.

Algunos factores que limitan la comercialización del arándano fresco y la aceptación del consumidor son: el deterioro por microorganismos, el ablandamiento de la fruta, los trastornos fisiológicos y la pérdida de agua (Vicente y col., 2007; Duan y col., 2011; Skurtys y col., 2011; Greco y col., 2012; Chun y col., 2013; Moggia y col., 2016). Los hongos asociados a las enfermedades del arándano son principalmente *Alternaria tenuissima*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Greco y col., 2012; Chun y col., 2013). En particular, *B. cinerea* es un patógeno ubicuo de la planta que causa la enfermedad del moho gris y provoca grandes pérdidas económicas, tanto a productores, como a procesadores, comercializadores y consumidores. Se desaconseja su control químico con fungicidas sintéticos debido a la capacidad de este hongo necrotizante para desarrollar resistencia y por los problemas de salud y ambientales causados por la posible toxicidad de los residuos de fungicidas (Mengiste y col., 2010). Por otra parte, el aumento del consumo de frutas frescas ha incrementado la frecuencia de enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas a su ingesta (Tzortzakis y Chrysargyris, 2017).

En consecuencia, es un desafío constante para la comunidad científica continuar con la búsqueda de estrategias de descontaminación alternativas seguras y efectivas contra microorganismos patógenos y no patógenos, para obtener frutos frescos de alta calidad. En los últimos años se han estudiado numerosos métodos químicos, físicos y biológicos (entre otros, radiación UV-C, luz pulsada, envasado en atmósfera modificada y ozonización) para controlar la vida útil poscosecha de frutas durante el almacenamiento en frío (Alzamora y col., 2000; Duan y col., 2011; Ngadi y col., 2012).

1.1 Objetivo general

El **objetivo** de esta tesis fue evaluar la eficiencia de la aplicación de ozono en fase acuosa y de luz ultravioleta de onda corta como factores no convencionales en tratamientos multifactoriales para inhibir y/o inactivar la micoflora de frutos de arándano, con miras a desarrollar nuevas técnicas de preservación poscosecha que causen mínimo impacto en sus atributos de calidad.

1.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto de la dosis de los tratamientos de ozono en fase acuosa y de luz ultravioleta de onda corta (UV-C), utilizados individualmente o en combinación, sobre la micoflora nativa y *B. cinerea* inoculado en frutos de arándano, al final del procesamiento y durante su almacenamiento refrigerado.
- 2) Realizar el análisis estructural del tejido de arándano fresco y tratado con ozono y/o luz UV-C mediante microscopía óptica y electrónica ambiental de barrido, a fin de obtener información sobre los cambios en los distintos aspectos/niveles de la estructura, inmediatamente después de los tratamientos y durante el almacenamiento.
- 3) Estudiar el comportamiento mecánico de arándanos enteros sometidos a ozono en fase acuosa y la luz UV-C, aplicados en forma individual o en combinación, mediante ensayos de penetración utilizando altas deformaciones. Evaluar el efecto de la intensidad de los tratamientos aplicados al día 0 y durante el almacenamiento.
- 4) Analizar los cambios físico-químicos: sólidos solubles, acidez, pH, humedad, pérdida de peso y color en arándanos frescos y tratados.
- 5) Evaluar los cambios en los compuestos bioactivos característicos (antocianinas y fenoles) y la capacidad antioxidante en arándanos tratados con ozono en fase acuosa y/o luz UV-C al día 0 y durante el almacenamiento.
- 6) Integrar los resultados obtenidos en los ítems anteriores con el fin de lograr un mejor conocimiento de la relación que existe entre los parámetros estudiados y proponer tecnologías para incrementar la vida poscosecha de frutos de arándano.



2. INTRODUCCIÓN

2.1 NUEVAS TECNOLOGÍAS DE DESCONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS

El mercado y los consumidores demandan productos microbiológicamente seguros y de alta calidad. En los últimos años muchos factores han influido en los hábitos de alimentación de los consumidores. Comenzó a observarse una nueva tendencia de consumo responsable, agroecológico y además se remarca la tendencia al consumo de “alimentos lo menos procesados posible”. El consumidor no sólo toma en cuenta el valor nutritivo de un alimento; además considera otros factores a la hora de la elección vinculados con el ambiente, la procedencia y la disminución de los desperdicios (Novelli, 2018). En este sentido la industria frutícola, no solamente tiene el gran desafío de obtener productos inocuos con excelentes propiedades nutricionales y características organolépticas (color, textura y flavor) que satisfagan la necesidad de los consumidores, sino que además tiene el desafío de incorporar tecnologías limpias y amigables con el ambiente.

El uso de las tecnologías convencionales como el tratamiento térmico para la inactivación microbiana y la extensión de la vida útil ha resultado muy eficaz; sin embargo estas tecnologías resultan en la degradación acelerada de la calidad sensorial, nutritiva y funcional de los productos alimenticios.

Los avances tecnológicos más recientes han permitido la aplicación de tratamientos menos drásticos a los alimentos con la promesa de obtener productos inocuos y de buena calidad. El objetivo de estos métodos incluye procedimientos que causen los mínimos cambios posibles en la matriz del alimento. Estas tecnologías han sido diseñadas para obtener alimentos naturales, simil frescos, con un mínimo deterioro en el color, la textura, el flavor y el contenido de nutrientes. Al mismo tiempo estas tecnologías deben proveer alimentos con la suficiente vida útil para ser transportados desde su lugar de producción hasta el consumidor (Alzamora y col., 2000; Ngadi y col., 2012).

Entre las principales tecnologías estudiadas se encuentran:

- alta presión,
- campos de pulsos eléctricos,
- radiación ionizante,
- luz pulsada de alta intensidad,
- *luz ultravioleta*,
- ultrasonido de alta intensidad,

- **ozono**,
- antimicrobianos naturales y otros.

2.1.1 El Ozono

El ozono se caracteriza por su alto potencial de oxidación que resulta en propiedades bactericidas y viricidas. Es un potente agente antimicrobiano de amplio espectro activo frente a bacterias, hongos, virus, protozoos, y esporas bacterianas y fúngicas. Como desinfectante es más eficaz y rápido que el cloro, reacciona con muchos materiales orgánicos y produce menos productos de descomposición (Cullen y col., 2010; Feliziani y col., 2016; Li y col., 2017).

El único producto de ozono que se genera cuando se descompone es oxígeno; por lo tanto, los productos alimenticios tratados con ozono no dejan residuos en los alimentos. Estas ventajas hacen del ozono una tecnología de procesamiento atractiva para la industria alimentaria (Karaca y Velioglu, 2007; Cullen y col., 2010).

El ozono (O_3) resulta de la reordenación de los átomos de oxígeno cuando sus moléculas son sometidas a descarga eléctrica de alto voltaje; la reacción de los radicales libres de oxígeno diatómico con el oxígeno dan lugar a la formación de moléculas de oxígeno triatómicas. El gas obtenido (ozono) posee un olor ocre o picante asociado al olor del aire fresco después de una tormenta, es de color azulado a temperaturas ordinarias y tiene fuertes propiedades oxidantes (Guzel-Seydim y col., 2004; Patil y Bourke, 2012).

Aunque en bajas concentraciones el ozono no es un gas extremadamente tóxico, las altas concentraciones de este gas pueden ser fatales para los humanos. En EE.UU., la Administración Federal de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) especificó límites de exposición al ozono con un umbral de 0,1 ppm para la exposición continua durante un período de 8 horas y de 0,3 ppm durante un período de 15 minutos (Guzel-Seydim y col., 2004; Perry y Yousef, 2011).

El ozono es parcialmente soluble en agua, relativamente estable en el aire, pero muy inestable en agua. Se descompone en un tiempo muy corto; consecuentemente no se puede almacenar y se debe generar *in situ*. El ozono a 20 °C tiene una vida media de 20 minutos y este tiempo aumenta conforme disminuye la temperatura.

En la naturaleza, la generación de ozono se produce cuando las moléculas de oxígeno reaccionan en presencia de descargas eléctricas y por la acción de la radiación electromagnética de alta energía. Existen varios métodos para la generación de ozono, entre ellos: de descarga eléctrica (arcos eléctricos de alta tensión), fotoquímicos (radiación UV), químicos, térmicos y electrolíticos (Patil y Bourke, 2012).

Método de descarga eléctrica (Corona)

En este método se utilizan dos electrodos: uno de alta tensión y uno de baja tensión (electrodo de tierra). Se hace pasar aire seco u oxígeno adecuadamente entre los dos electrodos separados por un material dieléctrico, que es generalmente vidrio (**Figura 2-1-1**). Cuando los electrones tienen la energía cinética suficiente para disociar la molécula de oxígeno, una cierta fracción de éstas colisiona y una molécula de ozono puede formarse a partir de tres átomos de oxígeno. Si se hace pasar aire como gas de alimentación a través del generador se puede producir 1-3 % de ozono, en cambio el uso de oxígeno puro como gas de alimentación permite rendimientos de hasta 6 % de ozono (Brodowska y col., 2018).

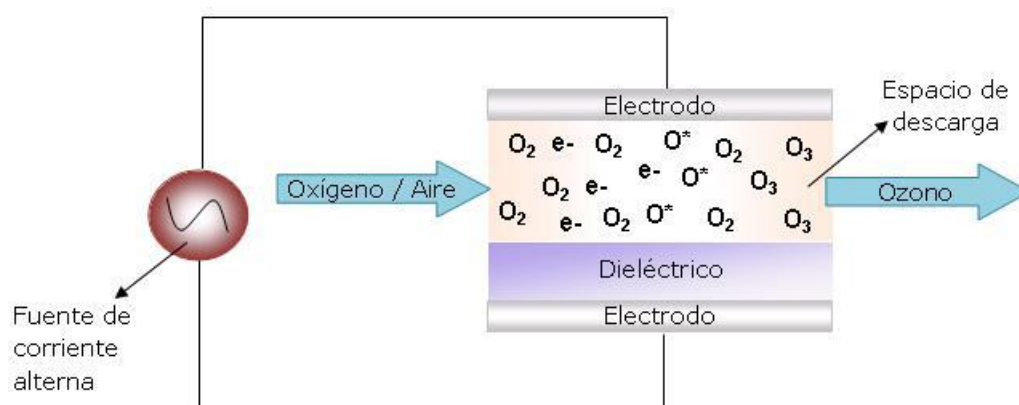


Figura 2-1-1. Esquema de la generación de ozono por el método de descarga eléctrica.

2.1.1.1 Factores que influyen en la eficacia del tratamiento con ozono

Hay diferentes parámetros que afectan la eficacia de desinfección del tratamiento con ozono (Patil y Bourke, 2012; Tzortzakis y Chrysargyris, 2017):

- parámetros extrínsecos: velocidad de flujo, concentración de ozono y temperatura, que afectan a la difusión y la solubilidad del ozono en los medios de desinfección.
- parámetros intrínsecos: pH y la matriz orgánica que afectan a la reactividad del ozono.

La eficiencia del ozono en la inactivación microbiana o la eliminación de residuos dependen en gran medida de factores medioambientales. Un aumento en la temperatura del medio acuoso resulta en la disminución de la solubilidad del ozono, y por lo tanto, disminuye su eficiencia. La descomposición de ozono también se acelera con el incremento de temperatura. La estabilidad y la eficiencia del ozono se incrementan al disminuir el pH. El

incremento de la humedad es otro factor que refuerza la eficacia del ozono (Tzortzakis y Chrysargyris, 2017).

Además de los factores mencionados anteriormente, la eficiencia del ozono se ve afectada por otro factor llamado “demanda de ozono del medio”. El ozono es una molécula muy reactiva y reacciona con casi todos los compuestos orgánicos e inorgánicos (Karaca y Velioglu, 2007). El término “ozono residual” es usado para una concentración detectable en el medio de tratamiento, después que el ozono se ha aplicado a un producto alimenticio específico. La efectividad del ozono (para la inactivación microbiana o degradación de residuos) depende de la cantidad aplicada, pero más del ozono residual en el medio. La estabilidad de ozono bajo condiciones de uso y la presencia de sustancias que demandan ozono en el medio de tratamiento afectan en gran medida el nivel de ozono residual (Kim y col., 2003). En comparación con otros medios de tratamiento, el agua pura tiene menos demanda de ozono. Las impurezas en el agua, por ejemplo, minerales, reaccionan con el ozono aplicado, y por tanto aumenta su demanda. El ozono aplicado en sistemas alimenticios, ricos en materia orgánica, reacciona con todos los compuestos y por ende la cantidad de ozono requerida (para la inactivación microbiana o degradación de residuos) es mayor (Karaca y Velioglu, 2007; Tzortzakis y Chrysargyris, 2017).

2.1.1.2 Efecto del ozono sobre los microorganismos

Los efectos bactericidas del ozono han sido estudiados para una variedad de organismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como esporas y células vegetativas. La eficacia antimicrobiana del ozono con respecto a los microorganismos relacionados con alimentos ha sido estudiada para levaduras (*Candida albicans* y *Zygosaccharomyces bacilli*), esporas de *Aspergillus niger* y bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*) (Guzel-Seydim y col., 2004; Guzel-Seydim y col., 2004; Horvitz y Cantalejo, 2014):

El ozono es muy inestable tanto en fase gaseosa o en solución, descomponiéndose en radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), hidropéroxido ($\bullet\text{HO}_2$) y superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). La reactividad del ozono se atribuye al poder oxidante de los radicales libres, que son responsables de la inactivación microbiana. La inactivación por el ozono es un proceso complejo que actúa sobre diversos componentes de la membrana y pared celular (por ejemplo, las grasas no saturadas) junto con el contenido de los componentes celulares (por ejemplo, enzimas y ácidos nucleicos) (Cullen y col., 2010; Brodowska y col., 2018).

Los microorganismos son inactivados por la ruptura o desintegración de la envoltura celular que conduce a la lisis celular. Tanto el ozono molecular como los radicales libres producidos por su descomposición juegan un papel importante en la inactivación, pero no hay un consenso sobre sus mecanismos de acción. La disrupción o destrucción de células por lisis asociada con el ozono es un mecanismo de inactivación más rápido que la de otros desinfectantes, que requieren que el agente desinfectante penetre a través de la membrana celular. En general, con respecto al espectro de la acción antimicrobiana, cada microorganismo tiene una sensibilidad inherente al ozono. Las bacterias son más sensibles que las levaduras y hongos; las bacterias Gram positivas son más sensibles al ozono que los organismos Gram-negativos y las esporas son más resistentes que las células vegetativas (Pascual y col., 2007).

2.1.1.3 Uso del ozono en la industria de alimentos

El ozono tiene numerosas aplicaciones potenciales en la industria alimentaria debido a sus ventajas significativas sobre los agentes antimicrobianos tradicionales tales como el cloro, sorbato de potasio, etc. (Cullen y col., 2010; Feliziani y col., 2016). El ozono como oxidante se utiliza en el tratamiento de agua natural, en el lavado y desinfección de frutas y verduras y en el procesamiento de jugos para la inactivación de microorganismos patógenos y de deterioro (Cullen y col., 2010; Brodowska y col., 2018). También se han utilizado tratamientos con ozono en la carne, aves de corral, huevos y alimentos secos (Karaca y Velioglu, 2007).

Los alimentos se tratan principalmente con ozono gaseoso o agua ozonizada. El tipo de tratamiento aplicado al producto depende del alimento (líquido o sólido) y del proceso (lavado o limpieza o si es aplicación directa). Estudios previos han demostrado que el ozono acuoso es más eficaz que el ozono gaseoso en la descontaminación de productos intactos, mientras que el ozono gaseoso presenta la ventaja como aditivo antimicrobiano directo en alimentos líquidos (Cullen y col., 2010; Horvitz y Cantalejo, 2014). Aunque el ozono es altamente efectivo contra los microorganismos en suspensiones de células puras, es poco probable que se utilice directamente en los alimentos cuya demanda de ozono sea alta, ya que los componentes orgánicos de tales alimentos compiten con los microorganismos por el ozono, y por lo tanto, pueden ser necesarias altas dosis de este agente para la eliminación eficaz de los microorganismos. Estos altos niveles de ozono también pueden alterar los atributos sensoriales, y afectar negativamente la aceptabilidad de los alimentos (Karaca y Velioglu, 2007).

En 1997 la United States Food and Drug Administration (FDA) reconoció al ozono como GRAS (Generally Recognized As Safe) para su utilización en contacto con alimentos.

No obstante fue en 2001 cuando este organismo aprobó la normativa del uso de ozono como aditivo directo de alimentos; ello generó interés entre investigadores y en la industria de alimentos (Perry y Yousef, 2011; Meireles y col., 2016).

2.1.1.4 Uso del ozono en la desinfección de frutas

En comparación con otras industrias alimentarias, es probable que el sector de productos frescos sea el más beneficiado con los avances recientes en la tecnología de desinfección con ozono. Existe información en que se señala que el uso de ozono bajo condiciones adecuadas de exposición durante el lavado y almacenamiento de frutas y hortalizas extiende su vida útil y preserva sus características organolépticas.

El efecto del ozono en fase acuosa o gaseosa sobre los distintos microorganismos patógenos y/o deteriorantes ha sido particularmente exitoso en productos con una superficie lisa, en donde este sanitizante tiene fácil acceso a los distintos contaminantes. Diversos estudios han establecido la efectividad del uso del el agua ozonizada para el lavado de frutos finos (tomates cherry, arándano, uvas, frutilla y otros) que previamente fueron inoculados con microorganismos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *B. cinerea* (Bialka y col. 2008, Contigiani y col. 2018, Pangloli y Hung 2013).

El **ozono en fase acuosa** se usa comúnmente en la desinfección de superficies de los equipos de empaque, en la desinfección del agua en sistemas de lavado, tanques de descarga o canales, y durante el lavado posterior a la cosecha de frutas y verduras, para controlar microorganismos patógenos y de deterioro, logrando un elevado grado de desinfección. Por otra parte, varios estudios han señalado que el ozono en fase acuosa no es muy efectivo en zonas de difícil acceso, por ejemplo: en superficies de frutos no lisas y/o en la zona de inserción del pedúnculo de algunos frutos donde los microorganismos se alojan y parecen estar protegidos de la oxidación por ozono debido al limitado acceso del ozono a esos lugares; tampoco es suficientemente efectivo cuando existen fisuras o heridas presentes en los frutos, debido a que el ozono reacciona con el material orgánico presente en la herida (Bataller-Venta y col., 2010; Horvitz y Cantalejo, 2014).

El lavado con agua ozonizada puede efectuarse por el método de aspersión con empleo de duchas y por inmersión de los productos en tanques o en canales de lavado. Para la inmersión, el agua puede ozonizarse previamente o se puede introducir una corriente gaseosa con ozono, mediante un burbujeo en el agua con el empleo de difusores o eyectores. Respecto a las duchas, el agua es ozonizada previamente y requiere de una concentración de ozono disuelto superior a

la necesaria en el método por inmersión. En todos los casos es importante garantizar un adecuado contacto entre el ozono disuelto y los productos a tratar (Bataller-Venta y col., 2010).

2.1.1.5 Efectos del ozono en la calidad de las frutas

La sensibilidad de una fruta al ozono varía según el tipo de fruta e incluso según los cultivares dentro del tipo de fruta (Horvitz y Cantalejo, 2014). Se ha mencionado en muchas investigaciones el efecto negativo del ozono en la calidad organoléptica de algunas frutas y vegetales. Qiang y col. (2005) señalaron que el tratamiento en fase acuosa o gaseosa disminuye el contenido de tioles en varias hortalizas y destacaron que la magnitud del efecto depende de la concentración de ozono, el tiempo de exposición, la superficie y el tipo de producto. Tiwari y col. (2009) demostraron que concentraciones altas y el largo tiempo de exposición al ozono dieron como resultado una degradación significativa de las antocianinas y el color en jugos de mora y jugo de uva, y una degradación de antocianinas y ácido ascórbico en jugo de fresa. Aunque el ozono podría extender la vida de almacenamiento de la frutilla, el tratamiento individual con ozono causó el blanqueamiento de la fruta, por lo que se sugirió la combinación con otros métodos, como el ultrasonido (Aday y Caner, 2014). Sin embargo, existen otros estudios donde se mencionan los efectos benéficos del ozono, por ejemplo el aumento de algunos compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante en frutos finos, como resultado de un mecanismo de defensa de los órganos de la planta al estrés oxidativo (Li y col., 2017).

Por lo tanto, la concentración de ozono, el tiempo de tratamiento y los métodos de aplicación deben evaluarse cuidadosamente para lograr el efecto máximo de desinfección y la degradación mínima de los componentes nutricionales en la aplicación futura.

2.1.2 Luz ultravioleta de onda corta (UV-C)

La irradiación con luz UV-C como tecnología de conservación es un proceso “frío”, simple y relativamente rápido, que no afecta significativamente la temperatura del alimento, ni su contenido de humedad, y por lo tanto, no causa daño térmico al producto. Es una tecnología limpia, no genera residuos químicos, tiene bajo costo de inversión, funcionamiento y mantenimiento, bajo consumo de energía y puede ser aplicada en combinación con otras tecnologías de conservación. Además, su uso está aprobado para la desinfección de superficies de alimentos (FDA, 2001).

Sin embargo, la aplicación de luz UV-C está limitada en algunos alimentos, debido a que la absorción de la radiación es proporcional al contenido de azúcares, sales, partículas suspendidas, color, tipo y concentración de la carga microbiana en el alimento. La principal desventaja que presenta es su bajo poder de penetración; por lo tanto no es eficaz en superficies rugosas o porosas y además en algunos casos los microorganismos pueden revertir los efectos destructivos de la luz UV-C mediante mecanismos de fotoreactivación (Gómez, 2010; Arosha y Ruplal, 2018).

2.1.2.1 Naturaleza de la luz UV

La luz ultravioleta forma parte del espectro electromagnético y se encuentra ubicada entre los rayos X y el espectro visible, abarcando un rango de longitudes de onda entre 10 y 400 nm (**Figura 2-1-2**).

Esta radiación es frecuentemente referida como “no ionizante”; sin embargo, las longitudes de onda ultravioleta más cortas pueden llegar a originar cierto grado de ionización. La porción ultravioleta del espectro ha sido subdividida de forma más o menos arbitraria: la región con longitudes onda menor a 200 nm se conoce como “UV extremo”; la región entre 200 y 300 nm como “ultravioleta lejano” y aquella entre los 300 y 400 nm como “ultravioleta cercano”. Otra subdivisión alternativa frecuentemente utilizada en la literatura es la siguiente: (Shama y Alderson, 2005; Li y Farid, 2016):

- Radiación ultravioleta de vacío (UV-V): entre 100-200 nm
- Radiación ultravioleta de onda corta (UV-C): entre 200-280 nm
- Radiación ultravioleta de onda media (UV-B): entre 280-320 nm
- Radiación ultravioleta de onda larga (UV-A): entre 320-400 nm

La radiación UV-A provoca cambios en la piel como el bronceado, envejecimiento, arrugas, pérdida de elasticidad. La radiación UV-B puede causar quemaduras en la piel y eventualmente cáncer. La radiación UV-C es la más dañina debido a que es absorbida por proteínas, ARN y ADN y puede provocar mutaciones en la célula, cáncer y/o muerte celular; también recibe el nombre de “rango germicida” debido a que es muy efectiva en la inactivación de muchos tipos de microorganismos tales como bacterias, virus, protozoos, hongos, levaduras y algas (Bolton, 2001).

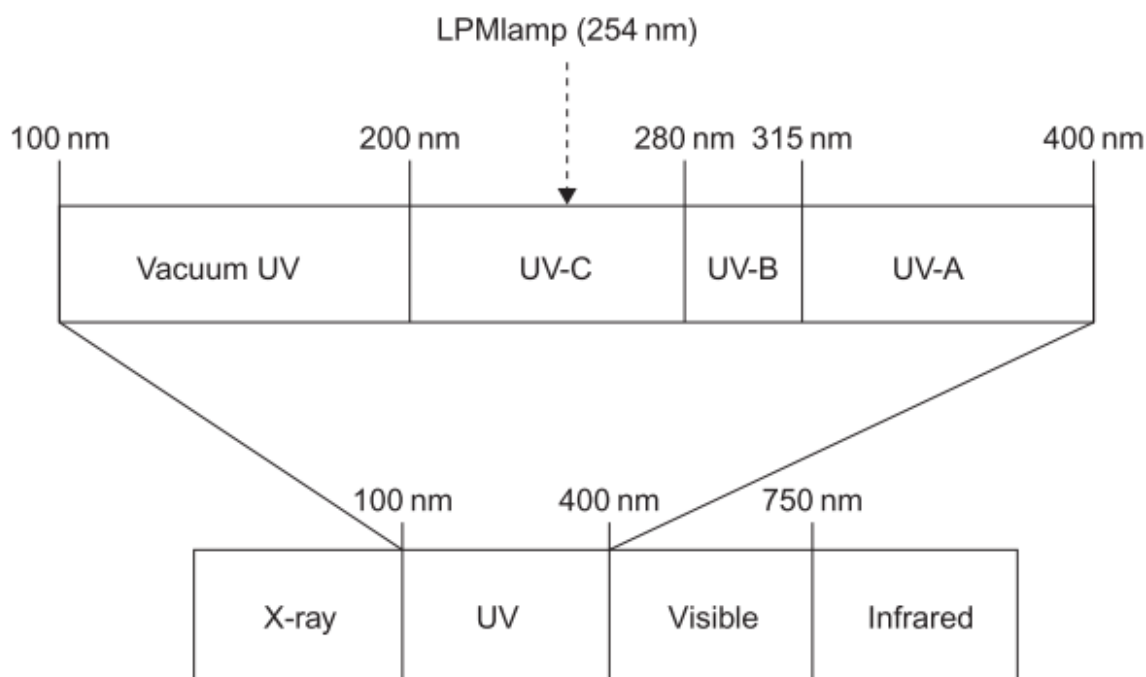


Figura 2-1-2. Espectro de radiación electromagnética con una división del espectro de luz visible y luz UV (Gómez-López y col., 2012).

Fuentes de luz UV-C

Las lámparas comúnmente utilizadas para la desinfección con luz UV-C consisten en tubos de cuarzo que contienen un gas inerte, tal como el argón, y pequeñas cantidades de mercurio. La diferencia que presentan con respecto a las lámparas fluorescentes es que no están recubiertas, transmitiendo la radiación generada por el arco. Las fuentes de radiación utilizadas para la desinfección UV-C pueden ser clasificadas en lámparas de arco de mercurio de baja y mediana presión (**Figura 2-1-3**) (Keklik y col., 2012; Li y Farid, 2016).

Una lámpara típica de arco de mercurio (**Figura 2-1-4**) consiste de un tubo de sílice vítrea o cuarzo, ambos transmisores de UV, herméticamente cerrado y con electrodos a ambos extremos. El tubo se llena con una pequeña cantidad de mercurio y un gas inerte, usualmente argón. Los electrodos están compuestos usualmente de tungsteno con una mezcla de metales de alcalinos para facilitar la formación del arco dentro de la lámpara.

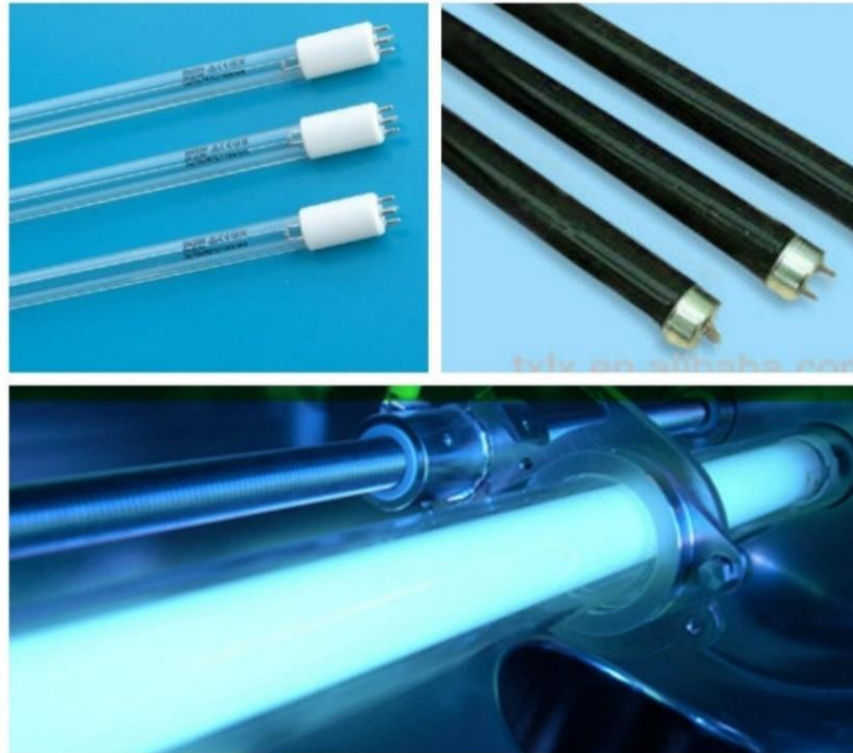


Figura 2-1-3. Lámparas de luz UV-C

Se logra una descarga de gas mediante la aplicación de un voltaje elevado a través de los electrodos. La lámpara emite luz UV cuando el vapor de mercurio, excitado por la descarga, retorna a un nivel menor de energía. El argón presente ayuda a encender la lámpara, extender la vida del electrodo, y reducir las pérdidas térmicas, pero no contribuye en sí a la emisión de luz UV por parte de la lámpara (Wright y Cairns, 1998; Vásquez Mazo, 2015)

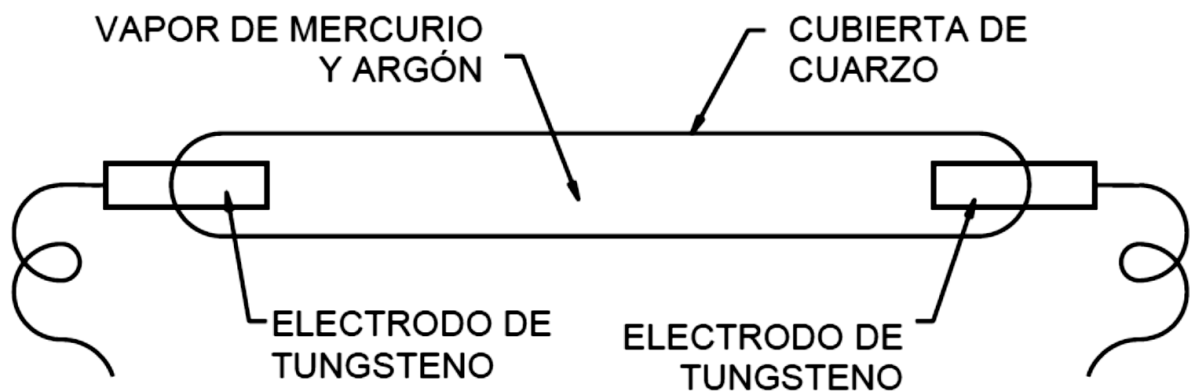


Figura 2-1-4. Componentes de una lámpara de arco de mercurio.

Las lámparas de baja presión presentan una alta eficiencia de energía (aproximadamente el 40% de la energía impuesta es convertida en radiación UV-C con un pico máximo de emisión en 254 nm). Las lámparas de mediana presión producen más líneas espectrales y son menos eficientes en emitir luz UV-C en el rango germicida pero producen intensidades de radiación más grandes, y por lo tanto, pueden alcanzar una determinada dosis de radiación UV en un tiempo de irradiación más corto (Keklik y col., 2012; Meireles y col., 2016).

Medición de la dosis

Cuando se quiere evaluar la energía de irradiación recibida por la muestra generalmente se mide la **irradiancia** o la **tasa de fluencia**. La irradiancia es definida como la energía de radiación total incidente que llega en dirección perpendicular a un elemento infinitesimal de superficie de área dA que contiene el punto en consideración dividido por dA . Por otro lado, la tasa de fluencia se define como la energía de radiación total incidente que llega de todas direcciones a una esfera pequeña infinitesimal con un área de sección dA , dividido por dA . Este último término es más apropiado para la desinfección UV, ya que el microorganismo puede recibir la irradiación desde cualquier dirección (Bolton y Linden, 2003). Las unidades de irradiancia y de tasa de fluencia en el Sistema Internacional son W/m^2 .

El término **dosis de UV** es utilizado universalmente en la literatura y se obtiene multiplicando la irradiancia o la tasa de fluencia, si se mantienen constantes, por el tiempo de exposición a la radiación. Sin embargo, la dosis de UV es un término que en otros contextos es usado para describir la energía total absorbida. En el caso de los microorganismos casi toda la luz ultravioleta incidente pasa a través del organismo y sólo un porcentaje es absorbido. Por lo tanto, el concepto de **fluencia** es apropiado ya que se relaciona con la energía UV “incidente” en vez de la energía UV “absorbida” (Bolton y Linden, 2003; Gómez-López y col., 2012). En este trabajo se utilizará entonces el término más común, dosis de UV, para referirnos al producto de la fluencia por el tiempo de exposición, expresada en kJ/m^2 .

La medición de la dosis de radiación UV puede llevarse a cabo por diferentes métodos. Uno de los ellos se basa en la medición con un **radiómetro**, que es un aparato que consta de un dispositivo selectivo el cual permite separar la parte del espectro de emisión que se desea medir y un detector fotosensible que permite transformar la energía incidente en una medida de voltaje o corriente (Gómez, 2010). Otra de las alternativas es la medición por **actinometría**. Esta técnica se basa en la medición de la luz UV incidente a través de una reacción fotoquímica, para la cual la cantidad de moléculas de producto formado por fotones absorbidos está bien

establecida. Por lo tanto, un actinómetro es una reacción fotoquímica o sistema químico donde la eficiencia cuántica (rendimiento cuántico) es conocida. La medición del rendimiento químico después de la exposición a la luz permite conocer el flujo de fotones incidentes (Bolton, 2001). Uno de los actinómetros químicos comúnmente utilizados es el par yoduro-yodato. La ventaja del uso del radiómetro es su fácil manejo y rápida obtención de los datos, mientras que las ventajas que posee el método actinométrico en relación a la radiometría es su bajo costo y además no requiere de calibraciones periódicas con respecto a un estándar ya que la eficiencia cuántica de los actinómetros no varía para un conjunto de condiciones (Bolton y Linden, 2003; Gómez, 2010)

2.1.2.2 Efecto sobre los microorganismos

Las longitudes de onda ultravioleta más letales para los microorganismos son aquellas que son absorbidas en mayor grado por las bases de ADN, y se encuentran en el rango entre 250-260 nm. Como se observa en la **Figura 2-1-5**, el máximo efecto germicida se ubica alrededor de los 254 nm y decae a valores cercanos a cero a 220 nm y 320 nm (Bintsis y col., 2000; Gómez-López y col., 2012).

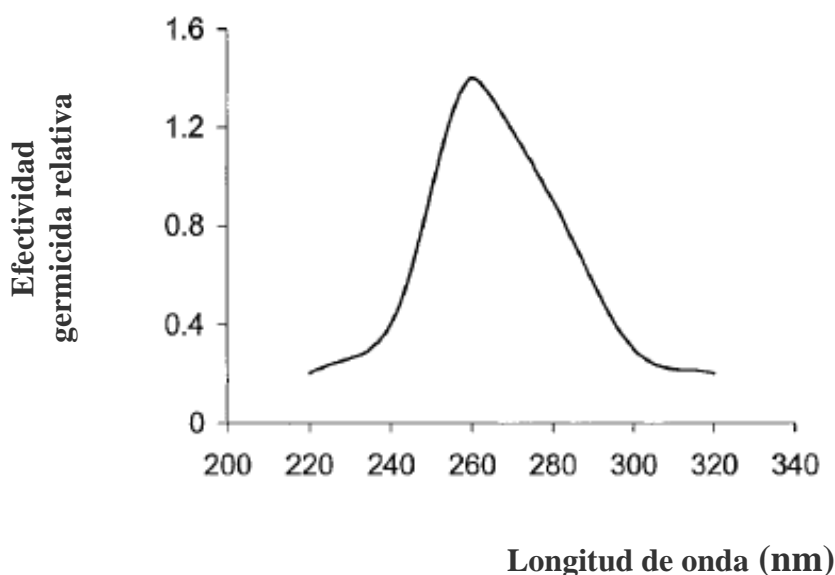


Figura 2-1-5. Efecto germicida de las longitudes de onda del espectro ultravioleta.

Si bien la luz UV-C puede provocar cambios en muchos componentes celulares, se ha reportado que las reacciones más significativas que determinan la supervivencia de las células ocurren por su interacción con los ácidos nucleicos. El daño provocado en el ADN se debe a

que induce la formación de “fotoproductos”. Entre estos los más importantes son los dímeros de pirimidina (citosina y timina) que se forman entre dos bases de pirimidina adyacentes. Los aductos de pirimidina son otro tipo de fotoproductos que pueden formarse entre bases adyacentes de pirimidina, pero con velocidades de formación mucho menores que los dímeros. Debido a la mutación de estas bases, la transcripción y la replicación del ADN es bloqueada, comprometiendo las funciones celulares y conduciendo eventualmente a la muerte celular. La irradiación a dosis altas también puede producir entrecruzamientos ADN-proteína e incluso la ruptura de la cadena de ADN. El daño causado en el ADN es proporcional a la cantidad de radiación UV a la que ha sido expuesto (**Figura 2-1-6**) (Bintsis y col., 2000; Shama y Alderson, 2005; Gómez, 2010; Keklik y col., 2012; Fan y col., 2017).

Casi todas las células vivas poseen la capacidad de revertir el daño causado en su ADN por la luz UV mediante el uso de uno o más mecanismos de reparación. Entre estos se encuentra la reparación fotoenzimática, en donde los dímeros de pirimidina son monomerizados enzimáticamente en presencia de luz. Otros procesos involucran la remoción de las secciones de ADN dañado y su resíntesis utilizando como molde una hebra de ADN intacta (Shama y Alderson, 2005). La capacidad de reparación de las células ha sido correlacionada con la intensidad de la luz UV-C a la que son expuestas. Por eso es importante la aplicación de una dosis adecuada de irradiación (Li y Farid, 2016). Los procesos de fotoreactivación pueden ser inhibidos almacenando el producto irradiado bajo refrigeración y/o en oscuridad (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004).

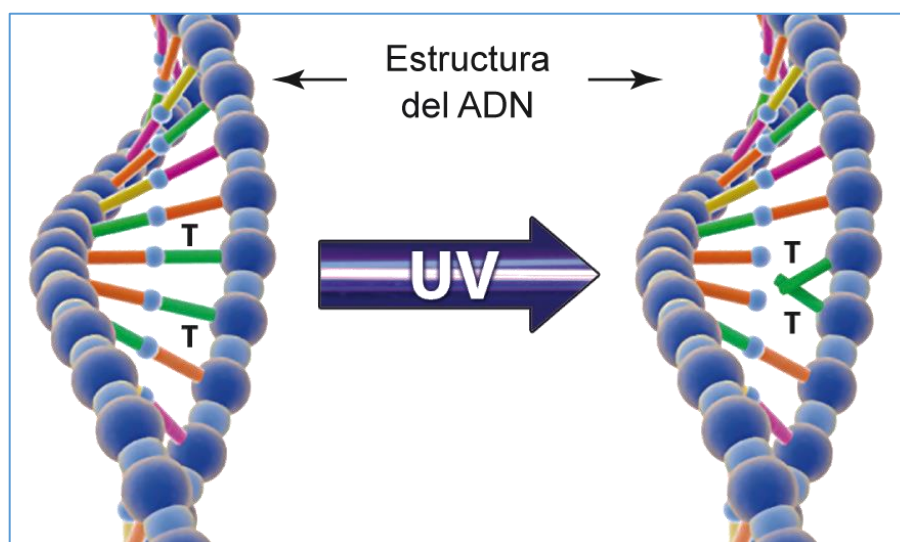


Figura 2-1-6. Daño celular provocado por radiación UV-C.

2.1.2.3 Susceptibilidad de los microorganismos a la luz UV-C

Con excepción de las bacterias fotosintéticas la mayoría de los microorganismos muestran susceptibilidad al daño ultravioleta. Los distintos microorganismos requieren de una dosis específica para ser inactivados, esta variación dependerá de la estructura de la pared celular, del espesor y composición de la misma, de proteínas que absorban la luz UV o de las diferencias en la estructura de los ácidos nucleicos. Diferencias entre especies y dentro de la misma (dependiendo de la cepa, el medio de crecimiento y el estado del cultivo), la densidad de los microorganismos y otras características como el tipo y la composición del alimento, pueden constituir factores importantes (Fan y col., 2017). Los hongos y levaduras por ser microorganismos de mayor tamaño son más resistentes que las bacterias. Los virus son más resistentes que las bacterias, mientras que los protozoos, que también son patógenos transmitidos por los alimentos, presentan cierta resistencia al tratamiento con luz UV (Bolton, 2001; Gómez, 2010). Las esporas bacterianas demuestran máxima resistencia y las dosis aplicadas usualmente no llegan a destruirlas. El estado fisiológico de las células también es un factor importante relacionado con la susceptibilidad de los microorganismos. Las células cuando se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento son más resistentes que cuando se encuentran en fase exponencial.

2.1.2.4 Aplicaciones de la luz UV-C en alimentos

La radiación ultravioleta ha sido ampliamente usada para la esterilización de superficies, utensilios, aire y materiales de empaque. También se utiliza para la desinfección de grandes cantidades de microorganismos en aguas potables y residuales y en la piscicultura. Sin embargo, con los años ha crecido el interés en su aplicación como una tecnología de preservación de alimentos (Bolton, 2001; Gómez y col., 2010; Keklik y col., 2012; Li y Farid, 2016).

Actualmente, esta tecnología se emplea tanto para la preservación de alimentos líquidos como sólidos (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). En alimentos líquidos se ha evaluado su uso para la inactivación de microorganismos en jugos de frutas y vegetales. El poder de penetración de la luz UV-C en líquidos depende del tipo de líquido, de su absortividad y del contenido de sólidos y de materia suspendida. Un incremento en la cantidad de sólidos puede provocar una disminución en la penetración de la radiación, mientras que la presencia de partículas suspendidas grandes pueden bloquear la incidencia de la luz sobre la población microbiana (Shama, 2006). Por ello es importante el uso de flujo turbulento durante el

tratamiento de líquidos, fluidodinámica que también posibilita la obtención de tiempos de residencia de los distintos elementos de volumen más uniformes. En EE.UU ha sido aprobado el uso de la radiación UV para el tratamiento establecido de 5 ciclos logarítmicos de reducción del patógeno más resistente en jugos frutales y vegetales, con el requerimiento adicional del flujo turbulento (FDA, 2000).

En frutas y vegetales, la aplicación de la luz UV-C ha sido estudiada con dos objetivos. Uno de ellos es reducir la carga inicial de microorganismos en la superficie del producto, y el otro, es inducir una respuesta al estrés (hormesis).

La hormesis puede ser definida como una respuesta beneficiosa de la planta que resulta de la aplicación de una dosis baja de un factor de estrés. Existen una variedad de tratamientos físicos, incluyendo la radiación UV-C, que pueden servir como factores de estrés. Las dosis óptimas para lograr efectos horméticos se encuentran en el rango entre 0,12 a 9 kJ/m². Este es un rango mucho más estrecho que el utilizado en la irradiación de alimentos para obtener efectos germicidas (Shama y Alderson, 2005; Shama, 2006).

Dentro de los efectos horméticos que se han reportado se encuentran la inducción de la síntesis de compuestos antifúngicos y el retraso de la maduración debido a la acumulación de las fitoalexinas (Rivera-Pastrana y col., 2007). La inducción de la formación de fitoalexinas estaría asociada con la estimulación de la producción de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) (Gómez, 2010; Li y col., 2017). En tomates se ha reportado un retraso de la maduración asociado con un incremento de la concentración de poliaminas después de la aplicación de dosis bajas de radiación UV-C (Maharaj y col., 1999). Las poliaminas son policationes de bajo peso molecular que se acumulan en las plantas en respuesta al estrés ambiental. Estos compuestos estarían implicados en las primeras etapas del desarrollo de las frutas. La disminución de la concentración de poliaminas sería un factor desencadenante de la senescencia (Shama y Alderson, 2005). Otros de los efectos benéficos reportados por diversos autores en diferentes frutas y vegetales es el incremento de los niveles de compuestos antioxidantes y fitoquímicos (Vicente y col., 2005; Rivera-Pastrana y col., 2007; Li y col., 2017).

En frutas y vegetales mínimamente procesados, la aplicación de la radiación UV-C se ha evaluado fundamentalmente con el propósito de inactivar microorganismos presentes en la superficie de estos productos. La irradiación UV-C fue efectiva para reducir la actividad microbiológica en anana, mango, tomate cherry, uvas, frutilla, arándano, manzana y otros (Nigro y col., 1998; Charles y col., 2009; Pombo y col., 2009; Gómez, 2010; Song y col., 2011; Janisiewicz y col., 2015; Pinheiro y col., 2015; Terao y col., 2015; Duarte-Molina y col., 2016; Sari y col., 2016; Xu y col., 2016)

La efectividad del tratamiento con luz UV-C en frutas está sujeta a algunos factores, como por ejemplo la dosis empleada, la fuente de luz, la especie, el cultivar, la geometría y las características de superficie de los frutos. Por lo tanto, los tratamientos deben ser evaluados cuidadosamente de tal forma que la dosis de irradiación aplicada reduzca al máximo la carga microbiológica, no genere efectos negativos en las propiedades sensoriales del producto y en la medida de lo posible mejore las características nutricionales y funcionales propias del alimento.

2.1.3 Combinación de tecnologías para descontaminación de alimentos

La mayoría de los métodos de descontaminación aplicados a los alimentos, ya sean biológicos (bacteriocinas, bacteriófagos, enzimas y fotoquímicos), químicos (peróxido de hidrógeno, ozono, ácidos orgánicos, etc.) y físicos (irradiación, filtración, ultrasonido, luz ultravioleta, etc.) han demostrado en muchos casos, poca efectividad en el control del crecimiento microbiano cuando se han aplicado como único factor. Por lo tanto, estos métodos suelen ser combinados con otros factores de estrés microbiano para aumentar su eficacia antimicrobiana. Algunas aplicaciones de combinaciones de métodos físicos-químicos (Gabriel, 2015), químico-químico (Singh y col., 2002), y químico-biológico (Arevalos-Sánchez y col., 2012) ya han resultado exitosas. El objetivo principal es lograr un mejor proceso de descontaminación. De hecho, la combinación de diversos métodos permiten una acción antimicrobiana más amplia (Goodburn y Wallace, 2013).

Una opción alternativa es la utilización de procesos de oxidación avanzados donde se utilizan simultáneamente dos o más oxidantes. El proceso más común utilizado para generar $\bullet\text{OH}$ es a través del uso de oxidantes catalíticos combinados tales como ozono-ultravioleta (O_3 -luz UV-C), peróxido de hidrógeno-ultravioleta (H_2O_2 – luz UV-C) y peróxido de hidrógeno-ozono (H_2O_2 – O_3). La combinación O_3 – luz UV-C proporciona el rendimiento máximo de $\bullet\text{OH}$ por oxidante; por este motivo, esta combinación ha atraído interés en la investigación (Teo y col., 2003; Beltrán y col., 2005; Selma y col., 2007; 2008). Sin embargo, actualmente hay poca información disponible sobre el uso combinado de O_3 – luz UV-C para descontaminación en la industria alimentaria.

2.2 EL ARÁNDANO

En los últimos años, el consumo de arándano ha crecido exponencialmente en todo el mundo debido principalmente a sus propiedades nutraceuticas. La producción mundial de arándanos ha aumentado más de 20 veces en las últimas 2 décadas, paso de 23,000 toneladas en 1995 a 545000 toneladas en 2014 (Iizuka y Gebreeyesus, 2018).

En América del Norte; EEUU y Canadá son los mayores productores de arándanos cultivados, a continuación está Chile, donde a pesar de ser un cultivo de reciente introducción, a principios de la década de los 80, se ha situado en poco tiempo como segundo productor mundial y representa el 90% de la producción de América del Sur. Chile, Argentina, Uruguay, México y Perú son los principales productores de nuestro continente. En Europa los principales países productores son Polonia, Alemania y España. Además, han surgido nuevas zonas productoras como Marruecos en África o Japón y China en Asia. En el resto del mundo otros productores relevantes son Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia (Rubio y col., 2013; Brazelton, 2016; Romero, 2016; Ministerio de Agroindustria, 2018) (**Figura 2-2-1**).

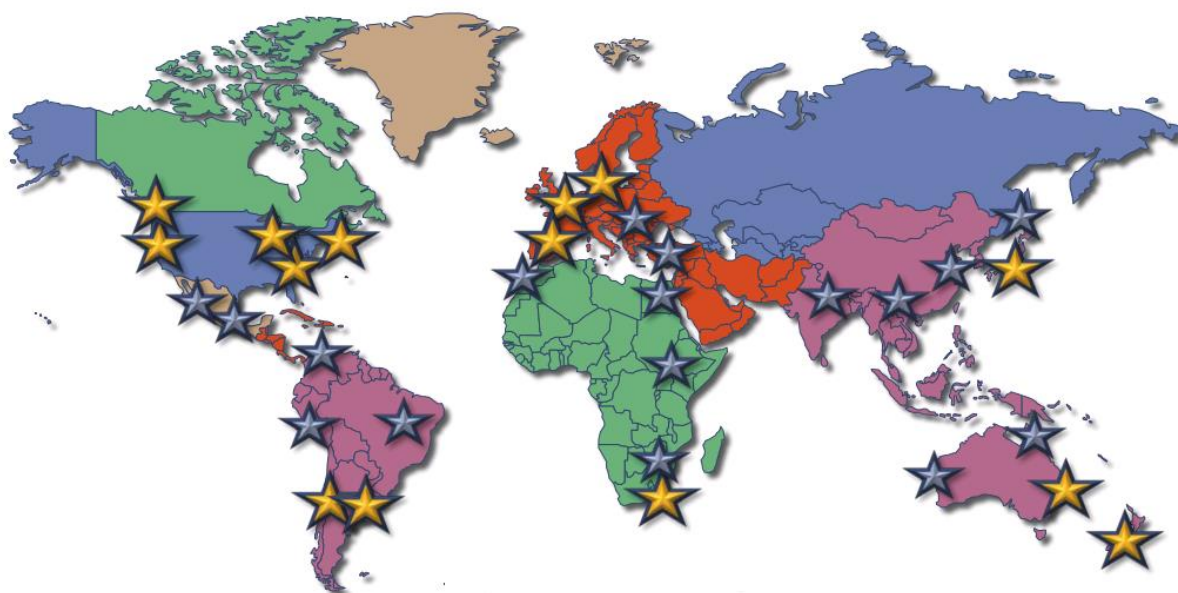


Figura 2-2-1: Países productores de arándano. Fuente Brazelton (2016).

Estados Unidos es el principal productor, consumidor e importador de arándano en el mundo. Canadá es el principal proveedor de fruta congelada y a diferencia de EEUU., la producción canadiense es en su mayoría silvestre. Argentina y Chile tienen la ventaja atractiva de suministrar arándanos a los países del hemisferio norte en contraestación. La mayor parte de

la cosecha comienza a mitad del mes de septiembre u octubre y se extiende hasta mediados de diciembre o febrero, respectivamente, justo cuando el Hemisferio Norte carece de frutos fresco debido a que se encuentran en estación invernal (Molina y col., 2010; Greco y col., 2012; Munitz, 2013; Moggia y col., 2016).

Por otra parte, además de EEUU, la demanda mundial se concentra principalmente Canadá y Reino Unido, entre estos tres países en conjunto adquieren el 80% de las toneladas comercializadas.

Mercado nacional

La información acá mencionada se tomó principalmente de la página del Comité de Arándanos Argentinos (ABC, Argentinean Blueberry Committe), la Guía Práctica del Cultivo de Arándanos-INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) y Programa Nacional Frutales-INTA.

En Argentina la producción de arándanos es relativamente nueva. Este cultivo en América del Sur recién se introdujo en la década de los 80; sin embargo, recién a partir de 1993 se observó un rápido aumento tanto en Argentina, como en Chile, gracias a la adaptación de estos frutales al medio agroecológico, alta rentabilidad y elevada demanda externa.

Argentina es el segundo mayor productor de arándanos de América del Sur, después de Chile, con 3500 hectáreas cultivadas aproximadamente. La mayor producción se concentra entre los meses de octubre a diciembre. Las tres zonas de mayor producción están identificadas como **NEA** (Entre Ríos, Corrientes y Misiones), **NOA** (Salta, Tucumán y Catamarca) y **Centro** (Buenos Aires, Santa Fe y San Luis). Las hectáreas producidas por cada zona en el año 2016 según ABC, se muestran en la **Figura 2-2-2**. El rendimiento promedio es de 5000 y 6000 kg/ha y una producción nacional que ronda las 20000 toneladas actualmente.

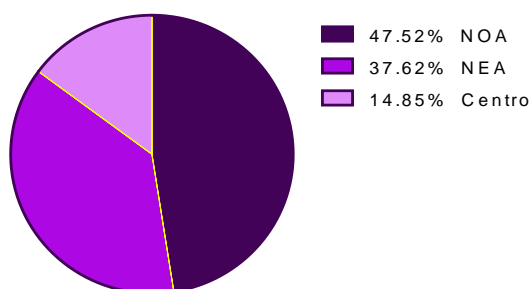


Figura 2-2-2: Porcentaje de hectáreas productoras en las zonas del NOA, NEA y Centro Argentino durante el año 2016 de un total de 2750 has. Fuente ABC.

Las exportaciones han ido creciendo respecto al año 2009 - 2010 (**Figura 2-2-3**). En la actualidad las principales provincias exportadoras de este fruto son Entre Ríos (Concordia) con el 40%, Tucumán con el 37% y Buenos Aires con el 20 %, el resto corresponde a otras provincias (Corrientes, Santa Fe, Salta, Catamarca, San Luis y Córdoba). Del total de toneladas cosechadas, el 95% se exportan, el 2 % son para el consumo local como fruta fresca (entre otras razones debido a sus altos costos) y el 3% restante se destina a la industria (jugos, mermeladas, pulpa congelada, repostería, productos liofilizados, etc.). El arándano fresco es enviado a 26 mercados internacionales, principalmente a EEUU (65%), Reino Unido (16%) y Europa Continental (15 %); a otros mercados se destina un porcentaje muy bajo (4%). A pesar de que el consumo interno es mínimo, la ABC que es quien agrupa a los principales productores y exportadores argentinos de arándanos, asegura que en el último año se ha logrado un incremento del 250% en el consumo local de este fruto, gracias a la campaña “Mejor con Arándanos” que promueve esta asociación; la misma está enmarcada dentro del programa “Más Frutas y Verduras” que lidera el Ministerio de Agricultura de la Nación.

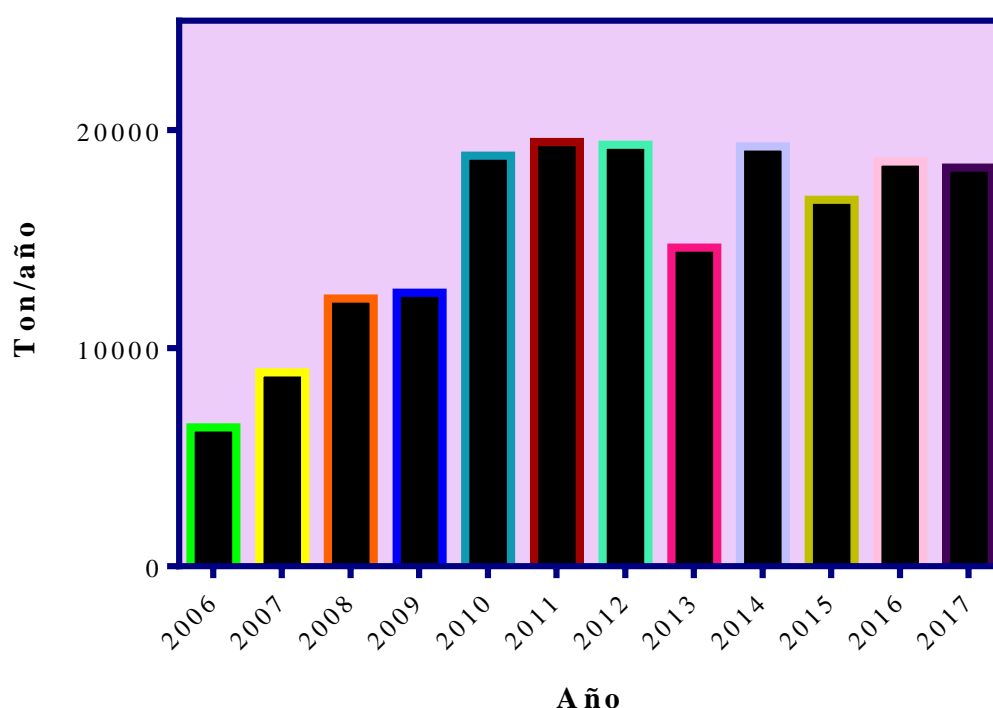


Figura 2-2-3: Exportación anual de arándanos en Argentina, periodo 2006-2017 (SENASA, 2017).

2.2.1 Características botánicas del arándano

El arándano (*Vaccinium* ssp.) es un fruto perteneciente al género *Vaccinium*, de la familia de las Ericáceas (las cuales incluyen aproximadamente 450 especies) y constituyen un grupo de especies ampliamente distribuidas por el Hemisferio Norte, básicamente por Norteamérica (Canadá y EEUU), Europa Central y Eurasia, encontrándose también en América del Sur (Chile, Argentina, Uruguay) y unas pocas especies en África y Madagascar (Michalska y Łysiak, 2015).

El género *Vaccinium* comprende más de 30 especies, pero solo un pequeño grupo tiene interés comercial. Las tres especies más cultivadas de arándanos son *Vaccinium angustifolium* Aiton (lowbush o arándano bajo); *Vaccinium ashei* Reade (arándano “rabbiteye” u ojo de conejo) y *Vaccinium corymbosum* L. (“highbush” o arándano alto). Este último representa más del 80 % del total de las especies cultivadas, seguida de *V. ashei* R. con un 15% aproximadamente (Buzeta, 1997; García Rubio y de Lena, 2011; Routray y Orsat, 2011). En Argentina las especies cultivadas son: *V. corymbosum* y *V. ashei* siendo la primera la de mayor difusión (Gordo, 2008).

Vaccinium corymbosum L. (“highbush” o arándano alto)

Se distinguen dos tipos de cultivares según los requerimientos de frío invernal necesarios para florecer:

- Arándano alto del norte (“Northern Highbush”, *V. corymbosum*): son cultivares adaptados a bajas temperaturas y que requieren entre 650 hasta 1200 horas de frío; a este grupo corresponden: Earlyblue, Blueray, Berkeley, Bluecrop, Coville, Jersey, Elliot, Brigitta, entre otras.
- Arándano del sur (“Southern Highbush”, híbridos inter - específicos de *V. corymbosum* y *V. darrowi*), corresponden a cultivares adaptados a climas más templados, cuyos requerimientos oscilan entre 200 y 600 horas de frío; entre los principales cultivares de este grupo se encuentran Star, O’Neal, Cape Fear, Blue Ridge, Misty, Esmerald (Muñoz y Moreira, 2002; Gordo, 2008).

Dentro de *Vaccinium*, los cultivares más plantados en Argentina son los del tipo de crecimiento arándano del sur; estos cultivares se encuentran en Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Salta, San Luis, Santa Fé y Tucumán. Otro grupo de menor relevancia

corresponde a los de arándano del norte y se encuentran plantados en la Patagonia (Río Negro y Chubut) (Rivadeneira y Kirschbaum, 2012). En la provincia de Buenos Aires, la principal variedad cultivada es la O' Neal de arándano alto. Se cultiva principalmente en zonas más cálidas, requiere entre 400 a 500 horas de frío acumuladas, tiene un crecimiento vigoroso, crece hasta 1,8 m y tiene un período de floración amplio. Los frutos son grandes, azul claro, firmes, de cicatriz pequeña, excelente sabor y de maduración temprana (Gordo, 2008; Retamales y Hancock, 2018).

Las especies *Vaccinium corymbosum* L. son arbustos de entre 1.5 y 3 metros de altura, crecen sobre suelos ácidos y húmedos. Es una especie autofértil. Sus **hojas** son simples, grandes, alternadas, de forma ovalada-lanceolada de unos 5 cm de longitud. Sus **flores** reunidas en inflorescencias en racimo de 6 a 10 en cada yema, sépalos persistentes, son de color blanco-rosadas de forma acampanada, formada por 4-5 pétalos fusionados, 8 a 10 estambres con anteras aristadas o no, prolongadas en tubos terminales con una abertura en el ápice, un pistilo simple, ovario ínfero, de 4 a 10 lóculos (Gordo, 2008; García Rubio y de Lena, 2011).

El **fruto** de arándano es una falsa baya redondeada de ovario ínfero, en el cual se aprecia una estructura similar a una corona que está formada por restos florales (**Figura 2-2-4, a**) y en el lado opuesto un hundimiento con una cicatriz, que se corresponde con la zona de inserción del pedúnculo (**Figura 2-2-4, b**). Después de la floración madura en 6 a 12 semanas.

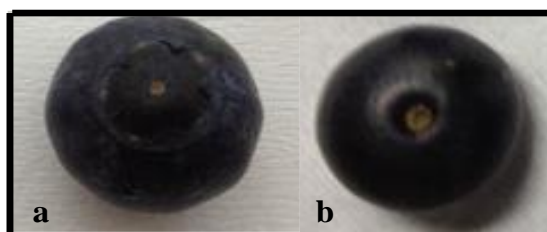


Figura 2-2-4: Parte superior e inferior de los frutos de arándano

Los frutos son de color azul violáceo casi negro dependiendo de la variedad. La epidermis está cubierta de una cutícula y ceras epicuticulares, razón por la cual el fruto adquiere una tonalidad opaca algo más clara, altamente apreciada por los mercados comerciales (**Figura 2-2-5**). La pulpa es jugosa, clara y con un gran número de semillas pequeñas. El color característico del arándano se debe al alto contenido de antocianinas que se encuentran concentrados principalmente en el epicarpo. La antocianina más frecuentemente encontrada es la cianidina y el amplio repertorio de colores que se muestra en el rango entre el rojo y el azul, es el resultado los complejos formados entre estos polifenoles, pectinas e iones metálicos.

Luego de alcanzar su color permanente, el arándano normalmente cambia poco en tamaño, pero continúa incrementando su dulzura y sabor. Los frutos son de una gran calidad gustativa, agridulce y jugosa. Dependiendo de la variedad, el fruto difiere en intensidad de color, sabor, tamaño y época de cosecha. (Fava, 2012; Garcia da Rocha Concenço y col., 2014; Michalska y Łysiak, 2015; Romero, 2016)

Los frutos de arándano maduros tienen una vida poscosecha muy corta; para extender su vida útil es necesario un control de temperatura y humedad adecuado durante el almacenamiento. De acuerdo a la literatura el arándano para su comercialización en fresco no debe ser expuestos a temperaturas superiores a 10 °C , siendo satisfactoriamente almacenado a 5 °C durante varias semanas dependiendo la especie; sin embargo la temperatura óptima recomendada es 0 °C con una humedad relativa de 90 – 95 % (Michalska y Łysiak, 2015).



Figura 2-2-5: frutos de arándano

2.2.2 Consideraciones anatómicas de los frutos (bayas)

La baya es un fruto carnosos, que comúnmente suelen tener forma redondeada o elipsoidal y a menudo colores llamativos. En términos botánicos, se define una baya como un fruto que suele tener múltiples semillas y un pericarpo grueso y jugoso que proviene de una flor de ovario súpero. En el **pericarpo** generalmente se distinguen tres estratos: **epicarpo**, **mesocarpo**, **endocarpo** (Bowling, 2000).

El *epicarpo* consta de la epidermis y 3-4 capas de células subepidérmicas, posee grosor variable y suele contener los pigmentos. El *mesocarpo* es relativamente y está constituido por células parenquimáticas más o menos isodiamétricas, dotadas por una gran vacuola y

citoplasma parietal y se ubica por debajo del epicarpo. El parénquima de muchas bayas contiene grupos de esclereidas dispersos. Estos grupos de células funcionan como mecanismo de soporte en el fruto. El *endocarpo* es un estrato interno de naturaleza variable (Fahn, 1982; Fava, 2012).

En términos generales la mayoría de los frutos carnosos se desarrollan a partir de los tejidos del ovario. En las primeras etapas del desarrollo se produce proliferación de células del pericarpo y almacenamiento de ácidos orgánicos mientras que durante la maduración se acumulan azúcares (Fava, 2012).

La interfase de las paredes celulares rica en pectinas, particularmente los dominios de homogalacturonanos no esterificados entrecruzados por calcio en la laminilla media, juega un rol importante en la adhesión célula-célula y la cohesión del tejido (Jarvis y col., 2003).

2.2.2.1 Descripción anatómica del epicarpo

El **epicarpo** en la mayoría de las bayas consta de una epidermis uniestratificada y 3-4 capas de células subepidérmicas colenquimatosas. La baya carece de un tejido mecánico y el tejido periférico (epicarpo) cumple la función de soporte. La epidermis de la baya está constituida frecuentemente por células pequeñas, isodiamétricas, de paredes gruesas, recubiertas por una gruesa cutícula en la pared tangencial externa. Frecuentemente se distingue una hipodermis del resto del mesocarpo por tener células de menor tamaño de aspecto colenquimatoso (Fava, 2012).

2.2.2.2 Pared tangencial externa de las células epidérmicas

Se han reportado varios tipos morfológicos básicos de la estructura de la pared tangencial externa (PTE) de las células epidérmicas. La PTE de las células epidérmicas se distingue del resto de paredes celulares por ser la pared más gruesa y estar impregnada de sustancias lipídicas o membrana cuticular (MC).

En un gran número de plantas terrestres, en un corte transversal observado desde afuera hacia adentro, la PTE de las células epidérmicas está compuesta de las siguientes capas: 1.- ceras epicuticulares (ce) , 2.- cutícula (c), compuesta por cutina, 3.- capa cutinizada (cc), formada por cutina y ceras intracelulares mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, 4.- capa péctica (cp), compuesta por pectinas y 5.- capa celulósica (p), constituida por celulosa, xiloglucanos (hemicelulosa), pectinas y proteínas

(Lyshede, 1982; Fava y col., 2006; Tafolla-Arellano y col., 2013), (**Figura 2-2-6**). La cutina y la capa cutinizada forman la membrana cuticular (MC) de la PTE.

Ceras epicuticulares e intracuticulares

La función de las ceras de actuar como la principal barrera protectora frente a pérdidas de agua por transpiración excesiva puede deberse a que es un complejo poliéster con ceras asociadas de naturaleza hidrofóbica y muy escasa reactividad, porque la mayoría de los grupos carboxílicos presentes en la membrana están esterificados con grupos hidroxilos alifáticos de otros ácidos grasos (Tafolla-Arellano y col., 2013).

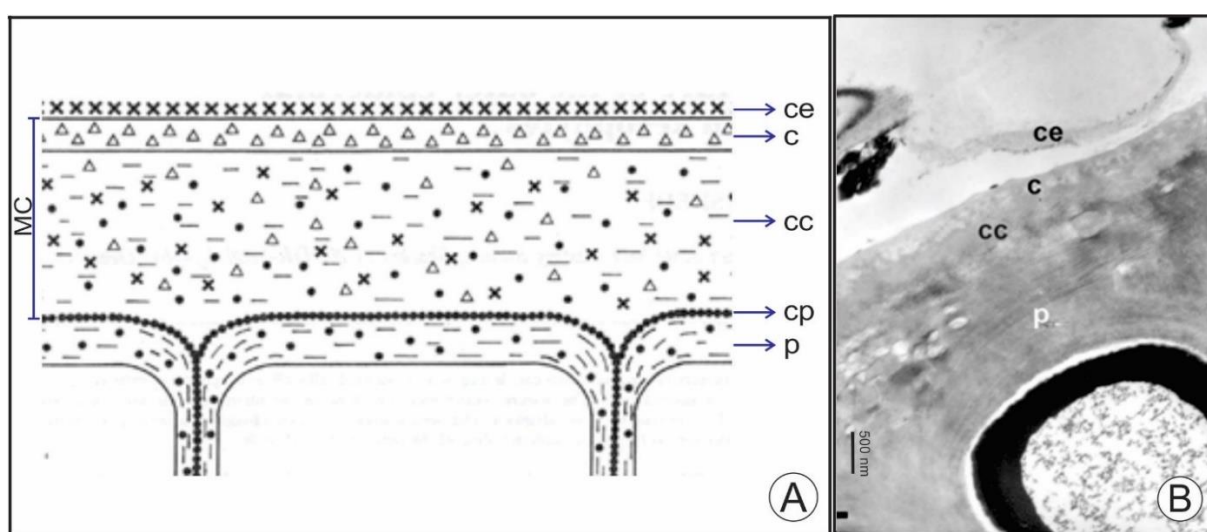


Figura 2-2-6. **A**, representación diagramática de la pared tangencial externa de una célula epidérmica (adaptado de Lyshede, 1982). X = ceras; Δ = cutinas; • = pectina; - = celulosa; MC = membrana cuticular. **B**, fotomicrografía con MET tomada de Fava y col. (2006), aspecto general de la sección transversal de la PTE de una célula epidérmica de un fruto de arándano [ceras epicuticulares (ce), cutícula (c), capa cutinizada (cc) y capa celulósica (p)].

La composición química de las ceras cuticulares varía entre los distintos grupos filogenéticos, dentro de los mismos grupos, especies, individuos o entre los distintos estadios de crecimiento de un mismo individuo. Los principales componentes químicos de las ceras epicuticulares son n-alcanos, ésteres, alcoholes y ácidos grasos de cadena larga (en las epicuticulares) o corta (intracuticulares). Además, se han encontrado algunos metabolitos secundarios como triterpenoides, compuestos fenólicos (ácido cumárico y ferúlico, flavonoides, fenilpropanoides), polisacáridos (principalmente celulosa y pectina) y algunos polipéptidos (Reina y Borraz, 1997; Tafolla-Arellano y col., 2013).

La ceras epicuticulares (**ce**) por lo general tienen una estructura semicristalina y se visualizan como una capa subyacente. La composición química de las **ce** es de suma importancia ya que existe una estrecha relación entre dicha composición y la morfología y ultraestructura de las mismas. De este modo, la presencia de unos u otros componentes va a determinar la aparición de estructuras de muy distintas morfologías: hélices, túbulos, cintas, varillas o placas. Así, los hidrocarburos y alcoholes primarios cristalizan en forma de placas, los alcoholes secundarios, cetonas y β -dicetonas (compuestos con cadena media) lo hacen como túbulos, los aldehídos cristalizan en forma de varillas y los dioles como cintas. Por el contrario, los triterpenoides y acil ésteres dan lugar a estructuras mayoritariamente amorfas (Percy y col., 1994; Reina y Borraz, 1997; Barthlott y col., 1998).

La cristalinidad de las ceras epicuticulares puede verse fuertemente alterada por el efecto directo o indirecto de los contaminantes ambientales tales como el ozono, lluvia ácida, o partículas de polvo ambientales. Estos efectos se manifiestan en el denominado "envejecimiento", ya que se produce un paso de estructuras más o menos cristalinas a estructuras predominantemente amorfas. El envejecimiento prematuro que se produce afecta a la permeabilidad de la cutícula vegetal y por tanto a la fisiología normal de la planta (Reina y Borraz, 1997).

Membrana cuticular

La membrana cuticular como ya se dijo, está constituida por ceras, polisacáridos y cutina. La proporción en la que estos componentes se encuentren en la MC es muy variable dependiendo del estadio de desarrollo y localización en la planta (Heredia, 2003).

La cutina es un biopoliéster insoluble de elevado grado de entrecruzamiento entre los ácidos grasos hidroxilados de cadena larga, los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, así como también glicerol. Debido a los enlaces covalentes entre sus monómeros, la cutina resiste daños mecánicos y forma la estructura básica de la cutícula. La cutina está formada casi exclusivamente por ácidos grasos de 16 carbonos, solamente una pequeña fracción de la cutina está formada por ácidos grasos de 18 carbonos (Tafolla-Arellano y col., 2013). El principal sitio de síntesis de cutina es la célula epidérmica. En el citoplasma se sintetizan los monómeros y éstos son transportados en alguna forma soluble a través de la pared celular hacia la superficie más externa de la célula donde polimerizan (Fava, 2012).

Desde un punto de vista fisiológico y ecológico, la MC (cutícula y capa cutinizada) y las ceras epicuticulares cumplen múltiples funciones en las plantas: reducen la pérdida

descontrolada de agua y solutos apoplásticos; forman una barrera mecánica contra la penetración de patógenos (hifas fúngicas e insectos); protegen los tejidos del daño mecánico; reflejan y atenúan la radiación; actúan como un compartimento para la acumulación de compuestos lipofílicos; constituyen un medio de percepción de señales; reducen la retención de agua en la superficie de las plantas; permiten la supervivencia de microorganismos de la filósfera y la deposición de contaminantes del aire, polvo, polen y esporas (Kersters, 1996; Fava, 2012).

Además, la estructura y las propiedades de la capa exterior (ce, c, cc) afecta significativamente la alteración en el contenido de compuestos biológicamente activos, ya que los polifenoles, incluidas las antocianinas, se encuentran principalmente debajo de la epidermis (Sapers y Phillips, 1985; Michalska y Łysiak, 2015). Sapers y Phillips (1985) en su estudio de pérdida de antocianinas de piel del arándano fresco con y sin cera, informaron que, si bien es cierto que un bajo contenido en ceras epicuticulares en los frutos de arándano, no afecta directamente la pérdida de antocianinas, la ausencia de éstas (ceras) aumenta la probabilidad de daños en la fruta ya que se debilitaría lo suficientemente la cutícula para permitir la ruptura de la piel, lo que conduce a una serie de fugas y, en consecuencia, expone la fruta a la pérdida de compuestos bioactivos, especialmente antocianinas que se encuentran bajo la epidermis.

Capa celulósica

La estructura de la capa celulósica, no cutinizada, consiste en una red de microfibrillas de celulosa unidas a los xiloglucanos y embebidas en una matriz de polisacáridos pécticos y proteínas estructurales (Carpita y Gibeau, 1993) y su organización en general responde a los modelos de pared celular publicados por Cosgrove (2001). En general, la pared celular es un fuerte entrelazado o trama fibrilar que da a cada célula su forma estable. Las microfibrillas de celulosa están recubiertas y a su vez entrelazadas por cadenas largas de xiloglucanos mediante uniones no covalentes. Los polisacáridos pécticos y las proteínas estructurales se imaginan como dominios que acompañan la red de celulosa-xiloglucano. Muchos trabajos sostienen que las hemicelulosas son organizadores físicos importantes de la arquitectura de la pared. Hasta el presente los principales modelos propuestos comparten la idea de microfibrillas de celulosa cubiertas con xiloglucanos.

La pared celular contiene, además, proteínas con actividad enzimática capaces de modificar los polisacáridos de la matriz. Así, los xyloglucanos son degradados y fragmentados por las endoglucanasas. Las esterases pueden remover grupos metilos de pectinas y clivar

uniones ésteres entre cadenas de polisacáridos. Las peroxidasas forman o rompen uniones fenólicas en la pared (Rose y Bennett, 1999).

Las microfibrillas de celulosa están interconectadas e inmovilizadas por la formación de entrecruzamientos (‘‘cross-links’’), contribuyendo a la rigidificación de la pared celular. Por lo tanto, se cree que la formación de entrecruzamientos entre las microfibrillas de celulosa causa la cesación de la elongación celular. (Fujino y col., 2000) postularon que durante la elongación en la pared celular no se observan entrecruzamientos entre microfibrillas de celulosa. En contraste, se observaron un gran número de entrecruzamientos entre microfibrillas de celulosa en la pared de células epidérmicas elongadas. La pared celular no es un espacio inerte; los cambios químicos que ocurren en ella dan idea de la dinámica del espacio apoplástico.

Como un complemento interesante para sumar a las convencionales técnicas de microscopia tradicional, la técnica de microscopia de fuerza atómica brinda imágenes de alta resolución (nanométrica) y ha sido usada para visualizar de manera tridimensional la nanoestructura de las paredes celulares del parénquima de *Malus sylvestris* Mill. (manzana), *Solanum tuberosum* L. (papa) y *Daucus carota* L. (zanahoria), donde se observó la disposición entrelazada de las microfibrillas de celulosa (Kirby y col., 1996). Del mismo modo, esta técnica permitió estudiar la superficie de los microcristales de celulosa en *Valonia ventricosa* J. Argadh (alga), donde se identificaron dos tipos de cristales: triclinico y monoclinicos (Baker y Hunt, 1981). Asimismo, se analizaron las variaciones del diámetro de las microfibrillas de celulosa en la pared celular de *Allium cepa* L. (cebolla) y en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. por efecto de tratamientos químicos específicos utilizando esta técnica microscópica (Davies y Harris, 2003).

2.2.3 Requerimientos ecológicos del cultivo de arándano (breve mención)

Las plantas de arándanos son arbustos originarios del norte de Norteamérica, regiones donde el clima es frío, los suelos son ácidos, livianos y turbosos (Munitz, 2013). Se puede adaptar a distintos climas dependiendo de la especie a cultivar. En general, el clima y las condiciones del tiempo afectan la calidad de los frutos, varios autores han mencionado que los frutos tienen mejor sabor en aquellas áreas donde los días son más largos y las noches son frías durante el período de maduración de la fruta (Perez y Mazzone, 2006).

Clima

Los arándanos crecen mejor en climas moderados. Dependiendo de la variedad, requieren entre 400 y 1200 horas frío (Tabla 1) con un umbral de 7 °C para cumplir su receso invernal. Una vez que las plantas rompen la latencia se vuelven muy sensibles a las bajas temperaturas. Para realizar una correcta elección de los cultivares a plantar es necesario conocer el período de ocurrencia de heladas del sector, de tal manera que estos eventos no coincidan con el período de floración. La flor se hiela a -2 °C, pero por la superposición de estados fenológicos se considera como temperatura crítica -0,6 °C (Undurraga y Vargas, 2013). Cuando la exigencia en frío no es satisfecha adecuadamente, la floración se prolonga excesivamente y la brotación se atrasa. Por el contrario, las plantas que cumplen anticipadamente en el año sus exigencias de frío pueden florecer en forma anticipada cuando la temperatura media supere los 10 °C.

Por otro lado, veranos nublados reducen la calidad de la fruta y favorecen la propagación de hongos. Así mismo, temperaturas altas, superiores a 28-30°C, pueden afectar negativamente al fruto al disminuir el sabor y ocasionar arrugamientos y quemaduras. Los vientos fuertes dominantes, sobre todo en los primeros años de vida de la planta, perjudican el crecimiento de ésta, provocando ocasionan brotes caídos, afectando a la floración por la caída de flores y a la polinización por insectos. También ocasiona la caída de frutos y lesiones en éstos (García Rubio y de Lena, 2011; Undurraga y Vargas, 2013).

Tabla 2-1. Requerimiento de horas de frío de diferentes cultivares de arándano

Especie	Hora de frío requeridas	Cultivares
<i>V. corymbosum</i> L.		
Northern highbush b.	800 a 1200	Earliblue, Blueray; Bluecrop, Jersey, Elliot, Brigitta
Sourthern highbush b.	700 a 1200	Ozarkblue
	400 a 600	O'Neal , Star, Bluecrips
	Menos de 400	Gulf coast, Esmerald, Milenia, Misty, Jewel
<i>Vaccinium ashei</i> Reade	250	Climax

Suelo

Generalmente el suelo no suele ser una limitante en los cultivos de arándano, cuando las condiciones no son las óptimas el agricultor puede hacer algunos esfuerzos económicos para mejorar los suelos donde se va a hacer la plantación. Conviene que el suelo esté previamente desmalezado, no sea muy alcalino y cuente con buen drenaje.

El sistema radical del arándano está compuesto principalmente por raíces finas y fibrosas que se concentran en un 80% a 50 cm de profundidad del suelo, es decir, muy cerca de la superficie. Estas raíces fibrosas carecen de pelos radicales y tienen relativamente baja capacidad de absorción. Las raíces del arándano no son capaces de atravesar superficies de suelo compactas, por lo que en condiciones ideales necesitarían suelos ácidos, livianos, con abundante materia orgánica (superior al de 5 %) y porosidad, esto permite mantener la retención de humedad necesaria para el óptimo desarrollo del sistema radical. (Gordo, 2008; García Rubio y de Lena, 2011; Undurraga y Vargas, 2013)

El rango de **pH** del suelo es muy importante en el cultivo, siendo el valor óptimo entre 4,5 y 5,5. Estos valores provocan la inhibición de las bacterias nitrificadoras presentes en el suelo, ya que los mismos son pobres en nitratos (Gordo, 2008; Munitz, 2013). El arándano del tipo "ojo de conejo" tolera suelos con pH ligeramente superiores (García Rubio y de Lena, 2011). Si el pH es alto es muy importante la determinación de la cantidad de azufre necesaria para acercarse a la acidez requerida, la cual es recomendable hacerla 3 meses antes de la plantación.

Los suelos ricos en calcio no son recomendables. Los mejores terrenos son los que están de praderas, sin restos de cultivos frutales o forestales, y sobre todo que no contengan herbicidas residuales.

Agua

Un adecuado abastecimiento de agua durante la temporada de crecimiento de las plantas de arándano es muy importante, ya que, debido a sus raíces superficiales, fibrosas y de poca extensión, el arándano es muy sensible al déficit y exceso de agua.

2.2.4 Manejo cosecha y poscosecha del arándano

Tanto la cosecha, así como la poscosecha constituyen un punto clave dentro de la cadena del manejo de producción de arándano, ya que, en una gran parte de ello depende el obtener frutos de excelente calidad (visible, organoléptica y nutritiva) para el consumidor interno o para los distintos mercados internacionales. Las principales características para tomar en cuenta son, entre otras: el sabor (dulzor/acidez), el aroma, la firmeza, la ausencia de daños (mecánicos y pudriciones), el color y junto a éste la presencia de ceras que rodean al fruto. Las ceras son una característica muy importancia para el consumidor, ya que lo relaciona con la frescura de la

fruta y la ausencia de éstas en el fruto resulta poco atractiva y generalmente asocia al arándano con un fruto de mala calidad (Undurraga y Vargas, 2013; Chu y col., 2018).

El arándano es un fruto climatérico con una alta tasa respiratoria y producción de etileno durante la maduración, ambos factores dependen de la variedad y, además, ésta última estará influenciada, al igual que otros frutos, por la temperatura. A pesar de lo antes mencionado, el arándano debe ser cosechado cercano a la madurez (color azul completamente uniforme, no necesariamente azul oscuro) ya que sus atributos organolépticos (sabor) no mejoran después de la cosecha.

Es importante considerar también que el arándano es un fruto muy susceptible a la pérdida de peso. Como se había mencionado anteriormente, la cutícula y la capa natural de ceras que rodean al fruto juegan un rol fundamental en el control de la pérdida de peso, así como en la prevención del ataque microbiano, por tanto, un buen mantenimiento de estas estructuras durante la cosecha y poscosecha extenderían la vida útil de los arándanos y disminuirían su deshidratación.

Cosecha

El primer factor para considerar es la selección del momento de cosecha adecuado para obtener una fruta de buena calidad; en este caso está definido por el color de la fruta (color azul uniforme). La variedad influye en el color del arándano al momento de la cosecha, hay cultivares que, aunque hayan cambiado su color a azul oscuro, no están lo suficientemente maduros para desarrollar un buen sabor en el fruto; por tanto, éstas frutas deben ser cosechadas después de desarrollar un buen sabor y cuando aún estén firmes para una adecuada comercialización (Munitz, 2013; Undurraga y Vargas, 2013).

Cuando el destino es el mercado fresco por lo general la cosecha es manual, mientras que si la fruta va a ser destinada a la industria transformadora la cosecha puede ser mecánica ya que no es necesario que la recolección sea tan delicada.

La cosecha manual tiene varias ventajas respecto a la cosecha mecánica; cuando el personal es entrenado, éstos pueden observar el grado de madurez y la calidad del fruto y así cosechar solamente estas bayas. Es decir, la cosecha es selectiva pues no todos los frutos pueden ser cosechados al mismo tiempo debido al amplio rango de grado de madurez que presentan los arándanos (los campos de arándanos pueden ser cosechados hasta 4 veces en intervalos de 5 a 7 días, **Figura 2-2-7 A**). Además, los frutos pueden ser cosechados con rapidez y sin daños (Fava, 2012; Munitz, 2013).



Figura 2-2-7: **A)** color de la fruta, factor a considerar antes de la cosecha. **B)** manipulación cuidadosa del fruto. **C), D)** bandejas cosechadoras. **E)** bandejas cosechadoras protegidas del sol. **F), G)** manipulación cuidadosa del fruto.

Cuando la recolección es manual antes de iniciar es muy importante cuidar la limpieza del lugar de cosecha y la de los trabajadores (manos limpias, pelo recogido, uñas cortas). Además, el personal debe estar lo suficientemente instruido para: evitar lastimaduras en el epicarpio del fruto al momento de desprender la fruta de la planta, disminuir los daños por golpe, impedir la remoción de la cera por sobre manipulación de la fruta, entre otras. La capacidad para resistir el daño durante las operaciones de cosecha varía considerablemente entre los cultivares.

Los frutos deben ser cosechados con cuidado de uno en uno y no acumularlos en la mano para evitar rotarlos o presionarlos (**Figura 2-2-7 B**), se debe recolectar todos los arándanos maduros de un arbusto antes de moverse al siguiente y dejar los inmaduros para la próxima cosecha (Fava, 2012). Las bayas cosechadas se colocan sobre bandejas tratando de protegerlas del sol (**Figura 2-2-7 E**), éstas no deben estar apoyadas en el suelo, tampoco sobrecargadas (1,5 kg. aproximadamente por bandeja) de tal modo que se minimice el

aplastamiento y/o la acumulación de calor por respiración. Además, el sobrellenado de las bandejas dificulta el posterior enfriamiento de los frutos.

Uno de los puntos más críticos para la prolongación de la vida poscosecha del arándano es la temperatura. Los frutos no deben estar expuestos a altas temperaturas durante las labores de cosecha; es fundamental el uso de sombreadores en las bandejas de recolección y un rápido transporte a los lugares de embalaje (packing) donde existe un control de temperatura (Gordo, 2008; García Rubio y de Lena, 2011; Undurraga y Vargas, 2013).

En relación con la cosecha mecánica la mayor ventaja de este método es la reducción de los costos de mano de obra (entre un 30 y 45 % respecto del costo de la cosecha manual). Una cosecha mecánica puede reemplazar a 100 recolectores. Una máquina hace vibrar o agita el arbusto y los frutos caen en un transportador sobre el cual pasa una ráfaga de aire limpiador (Fava, 2012). En este sistema de recolección es necesario tener en cuenta ciertas características fundamentales de los cultivares, por ejemplo: su porte erecto, facilidad de desprendimiento del fruto, firmeza y tipo de cicatriz de éste, así como la maduración concentrada. La cosecha mecanizada, tiene algunos inconvenientes ya que, a diferencia de la manual, no es selectiva, aumentando el porcentaje de destrío al incorporar fruta sobre-madura, enferma o dañada por insectos, los cuales son descartados luego por un recolector humano (García Rubio y de Lena, 2011). Los arándanos cosechados mecánicamente no son aceptados para el mercado fresco; por lo tanto, se congelan para su posterior procesamiento. Los compradores de este tipo de arándanos aceptan menos del 5 % del total defectuoso (Fava, 2012).

Poscosecha

La temperatura tiene una relación directa con el metabolismo de la fruta y con la vida poscosecha, por tanto, una vez cosechado el arándano es necesario reducir rápidamente la temperatura de la pulpa del fruto a valores entre 0 y 1 °C para asegurar un tiempo mayor de vida útil. El enfriamiento debe ser parejo y consistentemente aplicado para ser efectivo, y debe ocurrir máximo dentro de las cuatro horas de haber sido recolectados los frutos.

Junto con el uso de bajas temperaturas, es crítico mantener una alta humedad relativa (HR ~ 95 %) durante el almacenamiento y transporte ya que el arándano es muy susceptible a la pérdida de agua, afectando la apariencia del fruto y observándose como “arrugado”.

Con un buen manejo de cosecha, enfriamiento rápido y almacenamiento de los frutos a 0,5 – 1,1 °C y HR entre 90-95% los arándanos tienen una duración mínima de 14 días (Gordo, 2008; Fava, 2012; Undurraga y Vargas, 2013).

El método más recomendable para preenfriar arándanos es por aire forzado; éste permite alcanzar la temperatura deseada en los frutos en menos de una hora y de manera uniforme. Los arándanos cosechados deben ser enfriados tan rápido como sea posible pero siempre dentro de las cuatro horas de recolectados. Los frutos también pueden ser enfriados en cámaras convencionales en forma pasiva. Sin embargo, la remoción del calor es lenta e ineficiente, ya que en el centro de los envases o pallets el enfriamiento es inadecuado. El tiempo que tarde en alcanzar la temperatura adecuada el fruto es importante; varios estudios han mencionado que el porcentaje de pudrición de los frutos después del almacenamiento es menor cuando éstos fueron enfriados en tiempos muy cortos (Undurraga y Vargas, 2013).

Uso de atmósferas controladas y modificadas

Además del manejo poscosecha en arándanos (uso de bajas temperaturas), se ha evaluado una serie de tecnologías para extender su vida útil. Una de ellas es el uso de atmósferas modificadas (AM) y controladas (AC), las cuales se basan en la modificación de la composición de gases (O_2 y CO_2) en la atmosfera durante el almacenamiento y/o transporte. En ambas casos el principal efecto sobre la fisiología de la fruta es la disminución de la actividad metabólica así como el control de hongos.

En lo que se refiere a arándanos, en AM las concentraciones que han mostrado ventajas en la extensión de poscosecha son 2-5 % de O_2 y 10 -15 % de CO_2 a 0 °C. El uso de altos porcentajes de CO_2 (>10%) se deben básicamente a que son necesarios en el control de *Botrytis*. Sin embargo, el factor que determina qué concentraciones utilizar de estos gases para alcanzar un máximo beneficio poscosecha es la variedad de estos frutos, ya que el uso de concentraciones inadecuadas de estos gases (< 2 % de O_2 y > a 25 % de CO_2) pueden desarrollar procesos metabólicos que resulten en el desarrollo de sabores o aromas extraños en la fruta, pardeamientos o decoloraciones y una mayor incidencia de pudriciones (Undurraga y Vargas, 2013).

2.2.5 Incidencia de pudrición del arándano

En los frutos de arándano son varios los patógenos que pueden provocar el deterioro de los mismos. No se detallarán cada uno pero sí se enumerará aquéllos que han sido reportados con mayor frecuencia.

De los microorganismos que atacan estas bayas, algunos tienen la capacidad de penetrar en el fruto en estadios tempranos de crecimiento y permanecer latentes hasta que el fruto comienza a madurar. Otros, penetran en los frutos maduros, principalmente a través de la herida provocada durante la cosecha cuando el fruto se separa del pedúnculo (Perez y col., 2014). El desarrollo de podredumbres en el arándano es uno de los principales problemas; entre las más importantes la bibliografía señala: la podredumbre por moho gris, causada por *Botrytis cinerea*; podredumbre por antracnosis generada por *Colletotrichum* sp.; roya producida por *Pucciniastrum vaccinii*; momificación de arándanos causada por *Molinia vaccinii-corymbosi*, podredumbre por rhizopus causada por *Rhizopus* sp. Sin embargo, de las tres la de mayor incidencia es la pudrición por moho gris ya que es capaz de desarrollarse incluso a 0 °C (Gordo, 2008; Mehra y col., 2013; Munitz, 2013; Undurraga y Vargas, 2013; Perez y col., 2014).

2.3 ATRIBUTOS DE CALIDAD EN LOS ALIMENTOS

La calidad de los productos determina su valor para el consumidor y ésta, es una combinación de atributos que incluyen apariencia, textura y valor nutritivo y funcional. La importancia relativa de cada parámetro va a depender de cada producto y si va a ser consumido fresco o cocido (Kader, 2002).

Por su parte Abbott (1999) sugirió que el término calidad implica el grado de excelencia de un producto o de su idoneidad para un uso determinado. Además, menciona que la calidad de los productos abarca propiedades organolépticas (aspecto, textura, sabor y aroma), valores nutritivos, componentes químicos, propiedades mecánicas, propiedades funcionales y defectos.

A los consumidores, el orden de los atributos de calidad que normalmente los afectan a la hora de aceptar o rechazar un producto son: primero el aspecto visual y de color, seguido por el sabor, aroma y textura. El aspecto del producto suele determinar si un producto es aceptado o rechazado, por lo que éste es uno de los atributos más importantes de calidad. El valor nutricional y el valor funcional son características ocultas que afectan al consumidor en forma que no puede percibir, pero estos atributos de calidad son cada vez más valorado por los consumidores, científicos y profesionales médicos (Barrett y col., 2010).

En el caso de frutas y verduras, los consumidores juzgan la calidad de éstas en base a la apariencia y frescura, posterior a ello su satisfacción va a depender de la textura y sabor del producto, así como su calidad nutricional y funcional y la inocuidad de los mismos (Kader, 2002).

La apariencia de un producto es determinada por sus aspectos físicos como el color, el tamaño, la forma, el brillo, la consistencia y la integridad. También se hace referencia a la presencia de defectos internos y/o externos (golpes, daños mecánicos, daños fisiológicos, manchas, etc). Todos estos factores (apariencia) atraen al consumidor hasta que este lleve el producto a la boca donde en general recién perciben el aroma y sabor del producto (Hutchings, 2003; Barrett y col., 2010; Viñas y col., 2013).

El color y la forma son atributos de suma importancia que influyen en la selección de un alimento (Hutchings, 2003), el primer acercamiento del consumidor al alimento es por su color, aceptándolo cuando presenta un color adecuado o rechazándolo cuando su color no es el característico (Badui, 2006). Algunos estudios reportan que los consumidores rechazan los productos a los que intencionalmente se les ha modificado el color, aun cuando el resto de propiedades sensoriales (aroma, sabor y textura) permanecen inalteradas (Badui, 2012).

El color de un alimento depende de cuatro factores:

- el contenido de sus pigmentos naturales; los vegetales incluyen clorofilas, carotenoides, betalainas y flavonoides;
- el contenido de sus pigmentos naturales transformados durante el procesamiento, almacenamiento y preparación, como ocurre por ejemplo con la clorofila que pasa de color verde a café, los carotenoides rojos se oxidan y se convierten en anaranjados o las antocianinas que se alteran con el pH;
- la presencia de los colorantes usados como aditivos;
- las reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático (Badui, 2012).

Los frutos varían de color a medida que maduran pero además este factor también puede ser alterado a causa de los diferentes tratamientos poscosecha. Su percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de la calidad de los mismos. Incluso en algunos casos, lleva al consumidor a tomar la decisión de compra por inferir el sabor de un fruto desde su color (Steenkamp, 1990). Los colores rojos producidos por antocianinas prevalecen en frutos de climas templados, mientras que en áreas tropicales los colores amarillos y naranjas se deben al predominio de carotenoides y flavonoides (Mosqueda y Czyhrinciw, 1964).

➤ **Textura**

Las propiedades texturales de un alimento son “el conjunto de características físicas que surgen de los elementos estructurales de los alimentos detectadas por los sentidos, están

relacionadas con la deformación, la desintegración y el flujo del alimento bajo una fuerza, y son medidos objetivamente por funciones de masa, tiempo y distancia” (Bourne, 2002).

La textura es una propiedad sensorial cuyo estudio es complejo ya que el consumidor distingue con la boca, los ojos, las manos y el oído, y de esta forma puede describir el alimento como blando, cremoso, crocante, pegajoso, elástico, suave, untoso, viscoso, etc. En los alimentos existen dos grandes grupos de texturas: los que están en forma natural en los tejidos animales (carne, pescado, etc.) y vegetales (hortalizas, cereales y leguminosas), y los llamados coloides o dispersiones (Badui, 2012).

La textura de las frutas y verduras dependen en general de la turgencia, de la composición de las paredes celulares (celulosa, hemicelulosa, sustancias pépticas, proteínas, y en el caso de los vegetales la lignina) de las plantas individuales, la laminilla media y los plasmodesmos, que son los que mantienen la cohesión de células individuales en forma conjunta (Alzamora y col., 2000; 2008).

En los frutos enteros, y en particular en frutos de *Vitis vinifera* L., *Solanum lycopersicum* L. y *Vaccinium corymbosum* L., el epicarpo juega un papel muy importante en las propiedades mecánicas. Gran parte de la textura de los frutos enteros está dada por las características de la pared tangencial externa de las células epidérmicas, la presión de turgor de las células en particular y del fruto en general, y por la cantidad de capas de células subepidérmicas, ya que la forma de las células y el espesor de las paredes celulares tangenciales y radiales le ofrecen al epicarpo de los frutos propiedades mecánicas específicas (Waldron y col., 1997).

Cambios en la textura ocurren durante la maduración, principalmente asociados con el ablandamiento. Estos cambios afectan considerablemente el rendimiento poscosecha en relación con el transporte, almacenamiento, resistencia a patógenos y vida útil (Brummell y Harpster, 2001).

➤ **Flavor: aroma y sabor**

El término flavor integra la percepción del sabor y aroma de muchos compuestos (Kader, 2002). Los compuestos del aroma son volátiles y se perciben principalmente con la nariz, mientras que los receptores del gusto están en la boca y se ven afectados durante la masticación. El sabor se ha dividido en cinco sabores primarios: dulce, agrio, salado, amargo y umami (sabor que se asocia con sales de ácidos y nucleótidos). Los olores son mucho más diversos y difíciles de clasificar, sin embargo, se ha intentado agruparlos en: picante, floral, frutal, balsámico o resinosa y quemado (Barrett y col., 2010).

➤ **Valor nutricional y funcional**

Las frutas y vegetales son una fuente importante de nutrientes "macro", como la fibra y carbohidratos, y nutrientes "micro" como la vitamina C, A, E, minerales (Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu) y otros compuestos como los polifenoles y carotenoides (Kader, 2002; Barrett y col., 2010). Estas son relativamente bajas en calorías y grasa, no tienen colesterol, también tienen un bajo contenido de sodio y alto contenido de potasio. El ácido ascórbico en frutas y verduras mejora la biodisponibilidad de hierro en la dieta (Vicente y col., 2009).

La presencia de fitoquímicos en frutas y verduras que promueven la salud han sido considerados de gran importancia para la prevención de patologías crónicas, tales como enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cáncer, diabetes, y enfermedades neurológicas (Quintão-Teixeira y col., 2013).

El consumo de arándano ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas debido a su alto contenido en compuestos bioactivos que le confieren propiedades beneficiosas para la salud. El arándano es una fuente rica en compuestos fenólicos, contiene algunas vitaminas (C y E) y se ha reportado también la presencia de otros compuestos bioactivos como tocoferoles y carotenoides; todo esto en su conjunto contribuyen a su alta capacidad antioxidante. Sin embargo, la capacidad antioxidante de estos frutos se atribuye principalmente a su alto contenido de fenoles, principalmente a las antocianinas presentes en el arándano (Prior y col., 1998; Mazza y col., 2002; Sinelli y col., 2008; Barba y col., 2013; Pertuzatti y col., 2014).

Entre otras propiedades funcionales, al arándano se le atribuye la capacidad para reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, neuronales, determinados tipos de cáncer y diabetes, además de usar esta fruta en tratamientos de tracto urinario (Seeram y col., 2006; Boivin y col., 2007; Kalt y col., 2007; Duffy y col., 2008; García Rubio y de Lena, 2011). También se ha mencionado que los componentes antioxidantes presentes en el arándano podrían evitar trastornos neurodegenerativos (Zafra-Stone y col., 2007; Routray y Orsat, 2011). La Food and Drug Administration (FDA) lo considera un alimento bajo en grasas y sodio, rico en fibras alimentarias y vitamina C.

Generalmente, los arándanos frescos tienen un 84% de agua, 9,7 % de carbohidratos, 0,6 % de proteínas y 0,4 % de grasa. El valor energético promedio de una porción de 100 g de fruto fresco se estima en 192 kJ. El arándano es una buena fuente de fibra dietética; la fibra representa al menos del 3% al 3,5% del peso de la fruta. El contenido de vitamina C alcanza un

promedio de 10 mg/100 g de arándano; esto representa 1/3 de la ingesta diaria recomendada (Prior y col., 1998; Michalska y Łysiak, 2015)

El contenido total de polifenoles en arándanos varía de 48 a 304 mg / 100 g de peso de fruta fresca y depende estrictamente del cultivar, las condiciones de crecimiento y la madurez; su estimación puede variar también según el procedimiento analítico utilizado. Los polifenoles presentes en el arándano incluyen antocianinas, quercetina, kaempferol, miricetina, ácido clorogénico y procianidinas. Como se mencionó anteriormente, las antocianinas son los principales compuestos fenólicos presentes en el arándano; se ha informado que el contenido de antocianinas oscila entre 25 y 495 mg / 100 g de arándanos, y depende del tamaño de la fruto, de la etapa de maduración, condiciones ambientales climáticas previas a la cosecha y el almacenamiento. En estos frutos se han reportado diferentes tipos de antocianinas, entre ellas: malvidina -3-glucosa, malvidina-3-galactosa, malvidina-3-arabinosa, petunidina-3-glucosa, petunidina-3-galactosa, petunidina-3-arabinosa, delphinidina-3-glucosa, delphinidina-3-galactosa, delphinidina-3-arabinosa, peonidina-3-glucosa, peonidina-3-arabinosa, cianidina-3-glucosa, cianidina-3-galactosa y cianidina-3-arabinosa (Howard Luke y col., 2003; Fava, 2012; García da Rocha Concenço y col., 2014; Pertuzatti y col., 2014; Michalska y Łysiak, 2015)



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

Con el objeto de disponer de frutos frescos y controlar el tiempo transcurrido desde la cosecha hasta el momento de los ensayos (períodos no mayores a 2 días), se utilizaron frutos orgánicos de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano alto) cultivar O' Neal del campo "Estancia La Julia", ubicado en Km 126 de la Ruta Nacional N° 5 de la localidad de Suipacha, provincia de Buenos Aires. Se destaca la importancia de haber empleado frutos provenientes de campos frutícolas identificados, ya que se pudieron controlar variables como: fecha de cosecha, lugar de procedencia, cultivar de la especie, condiciones de almacenamiento y procesos de lavado y acondicionamiento.

Los frutos fueron seleccionados teniendo en cuenta tamaño, forma y contenido de sólidos solubles, de modo tal de trabajar con un lote homogéneo y disminuir la variabilidad biológica y estado de madurez. El tamaño de los frutos fue de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm de diámetro, pH $3,5 \pm 0,5$ y contenido de sólidos solubles $13 \pm 1,0$ °Brix. Los arándanos fueron almacenados en refrigeración ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta 1 hora antes del momento de su utilización.

Dado que la cosecha de frutos de arándanos cv. O'Neal en el campo mencionado se produce sólo durante el mes de noviembre de cada año, los ensayos planteados en esta tesis fueron realizados durante los años 2014-2017.

Ensayo	Año de cosecha											
	2014 2015 2016 2017				2014 2015 2016 2017				2014 2015 2016 2017			
Micobiota nativa		✓				✓					✓	
<i>Botrytis cinerea</i>			✓				✓				✓	
Propiedades mecánicas	✓					✓				✓		
Color	✓					✓					✓	
Pérdida de peso	✓					✓					✓	
Microscopía óptica	✓					✓				✓		
Microscopía electrónica de barrido ambiental			✓				✓				✓	
Caracterización físico-química				✓				✓				
Antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante				✓				✓				

3.2 Reactivos y medios de cultivo empleados

- AAPH ((2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorado) (Sigma-Aldrich, EEUU)
- ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) (Biopack, Argentina)
- Acetona ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) (Biopack, Argentina)
- Ácido clorhídrico (HCl) (Biopack, Argentina)
- Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4) (Biopack, Argentina)
- Ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Agar extracto de malta (AEM) (Merck, Alemania)
- Alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) (Biopack, Argentina)
- Azul de toluidina ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{S}$) (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Biopack, Argentina)
- Cloroformo (CHCl_3) (Merck, Argentina)
- Cloruro de potasio (KCl) (Mallinckrodt, EEUU)
- Di-potasio hidrogeno fosfato (K_2HPO_4) (Merck, Alemania)
- Hipoclorito de sodio (NaClO) (cloro activo: 55 g/l, C+P, Argentina)
- Fluoresceína ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$) (Sigma-Aldrich, EE.UU)
- Fosfato de potasio (K_3PO_4) (Merck, Argentina)
- Glutaraldehído ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) (Merck, Argentina)
- Índigo trisulfonato de potasio ($\text{K}_3\text{C}_{16}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$) (Sigma-Aldrich, EE.UU)
- Ioduro de potasio (KI) (Biopack, Argentina)
- Persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Biopack, Argentina)
- Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) (Merck, Argentina)
- Reactivo de Folin Ciocalteau (FCR) (Merck, Alemania)
- Resina Spurr (Merck, Argentina)
- Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Argentina)
- Tetróxido de osmio (OsO_4) (Merck, Argentina)
- Solución buffer pH 4 (Biopack, Argentina)
- Solución buffer pH 7 (Biopack, Argentina)
- Trolox ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$) (Sigma-Aldrich, EEUU)
- Tween 80 (Biopack, Argentina).

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, excepto el alcohol y el NaClO.

3.3 Descontaminación de frutos con ozono en fase acuosa

3.3.1. Descripción del equipo

Para el tratamiento de descontaminación de frutos con ozono en fase acuosa se empleó un equipo a escala laboratorio (**Figura 3-3-1**). El mismo estaba provisto de un generador de ozono UTK-O-4 (Unitek S.A., Argentina), una columna de burbujeo con difusor incluido y un tanque de oxígeno envasado (pureza 99,5 %, Oxígeno Central, Argentina). El generador UTK-O-4 producía ozono a partir de oxígeno con una presión de trabajo de 0,62 bar (9 psi), regulada por una válvula reguladora modelo LRP-1/4-2,5 (Festo, Argentina) y un caudal de alimentación de 5 L/min medido con un rotámetro (Unitek S.A., Argentina).

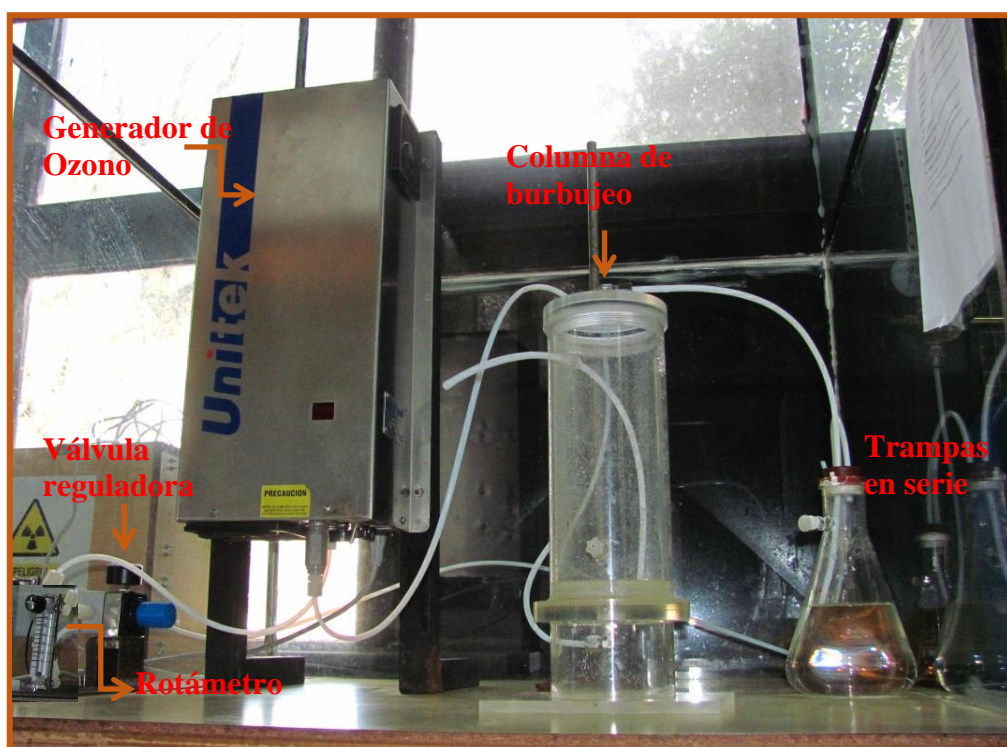


Figura 3-3-1. Equipo a escala laboratorio para el tratamiento de descontaminación de frutos con ozono en fase acuosa.

Dentro del generador, el oxígeno pasaba a través de los tubos entre un electrodo y un dieléctrico. En ese espacio (cámara de reacción), el gas base se exponía a una corriente eléctrica de alto voltaje, lográndose la disociación de las moléculas de oxígeno y su transformación en ozono (**Figura 3-3-2**). El generador poseía un potenciómetro que regulaba la generación de ozono entre 0 y 100 % de la capacidad nominal.

La columna de burbujeo tenía un diámetro interno de 10 cm y una altura de 24 cm, con un difusor en la base que permitía la formación de pequeñas burbujas y una distribución homogénea del ozono en el agua. El ozono generado entraba por la base de la columna atravesando el líquido en forma de finas burbujas, y el excedente de ozono era neutralizado en dos trampas colocadas en serie con una solución 2 % p/v de KI. El equipo se encontraba montado dentro de una campana de ventilación diseñada para eliminar a la atmósfera el ozono excedente y para garantizar un ambiente seguro de trabajo.

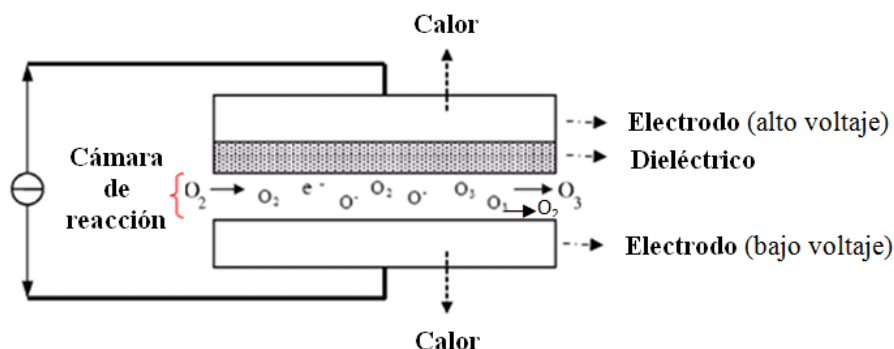


Figura 3-3-2. Representación de la generación de ozono en el generador UTK-O-4.

3.3.2 Determinación de la concentración de ozono en la fase acuosa

Las concentraciones de ozono en la corriente gaseosa de entrada a la columna de burbujeo fueron de 10 ± 2 y 18 ± 2 mg $O_3 \cdot L^{-1}$. Estas concentraciones fueron determinadas previamente mediante el método yodométrico (Rakness y col., 1996), por integrantes del grupo cuando el equipo fue puesto a punto. El ozono gaseoso fue burbujeado en 1500 ml de agua destilada a $20 \pm 1^\circ C$.

Posteriormente se determinó la concentración de ozono disuelto en fase acuosa en agua destilada y en agua destilada conteniendo frutos de arándanos por el método colorimétrico Índigo (Bader y Hoigné, 1982). Se prepararon las siguientes soluciones: 1) **Solución índigo madre (SM)**: En un matraz de 100 mL fueron añadidos 0,077 g de índigo trisulfonato de potasio ($K_3C_{16}H_7N_2O_{11}S_3$), 0,1 mL de ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4) y luego se llevó al aforo con agua destilada. La dilución 1:100 de esta solución debía presentar una absorbancia de $0,2 \pm 0,1$ /cm a 600 nm. La SM es estable durante 4 meses almacenada en refrigeración y a oscuras. 2) **Solución índigo reactivo (SII)**: Se preparó por dilución 1:10 de la SM. En un matraz de 50 mL fueron agregados 5 mL de SM, 0,5 g de fosfato de sodio dihidrógeno (NaH_2PO_4) y 0,35 mL ácido fosfórico concentrado; finalmente se llevó al aforo con agua destilada. Una vez obtenidos

los reactivos, se prepararon tubos que contenían 1 mL de SII, 8,5 mL de H₂O destilada y 0,5 mL de agua destilada burbujeada con O₃ durante diferentes tiempos (0 a 30 min). Los tubos inmediatamente fueron agitados y posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) a una longitud de onda de 600 nm. El blanco fue preparado de la misma forma pero sin la solución ozonizada. Los resultados de la concentración de ozono en la fase acuosa se expresaron en mg O₃.L⁻¹ de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{mg O}_3/\text{L} = \frac{V_t \cdot (\Delta \text{Abs})}{f \cdot b \cdot V} \cdot 100 \quad (3-1)$$

donde:

V_t = volumen total (10 mL), Δ Abs = diferencia de absorbancia entre la muestra y el blanco, b = paso óptico de la cubeta: 1 cm, V = volumen de la muestra añadida (0,5 mL), f = 0,42 L/mg cm⁻¹, coeficiente de absorción del ozono en fase acuosa (Bader y Hoigné, 1982)

3.3.3 Concentración de ozono y tiempos de exposición

Para evaluar el impacto de la dosis de ozono en fase acuosa sobre la micobiota nativa del arándano y algunos parámetros de calidad, las muestras fueron expuestas a ambas concentraciones de ozono en el gas de entrada ensayadas (10 y 18 mg O₃.L⁻¹) durante 0 (control), 5, 10, 15, 20 y 30 min (este último tiempo solo se ensayó para la mayor concentración de ozono). Las experiencias fueron realizadas el número de veces necesario a fin de realizar todas las evaluaciones programadas, incluyendo cada tratamiento 60 arándanos.

Se utilizaron los siguientes controles: arándanos frescos recién llegados al laboratorio después de la cosecha (FF) y arándanos que fueron sumergidos en agua destilada en la que sólo se burbujeaba oxígeno bajo las mismas condiciones operativas y tiempos que en el caso de los arándanos tratados con ozono (Control O₂ X min).

3.4. Descontaminación de frutos con luz UV-C

3.4.1 Descripción del equipo

La cabina de luz UV-C estaba provista de cuatro lámparas germicidas (máxima emisión a 253,7 nm), 2 colocadas en la parte superior (c/u: TUV-15W, G15 T8, Philips, Holanda) y 2 laterales (c/u: TUV-6 W, G6 T5, Philips, Holanda), dentro de una caja de madera herméticamente cerrada de 40 cm de alto x 100 cm de largo x 30 cm de ancho (**Figura 3-4-1**). Con la finalidad de que todas los frutos recibieran la misma dosis durante el tratamiento, estos fueron ubicados en una zona de igual irradiancia sobre un agitador M-23 Vicking (Argentina) forrado con papel aluminio a 250 rpm, centrado y colocado a 8 cm de distancia por debajo de las lámparas superiores y 30 cm a cada lado de las lámparas laterales. La cabina contaba con un sistema de ventilación (Ecoclima, Argentina) para evitar el incremento de temperatura producido por la radiación UV-C. La temperatura promedio alcanzada durante los tratamientos fue de 30 ± 1 °C. Antes de su uso, las lámparas se estabilizaban durante 30 min.

3.4.2 Determinación de la intensidad de radiación UV-C

Las intensidades de radiación UV-C emitidas por las lámparas fueron medidas con un radiómetro (Broadband Power/energy Meter 13 PEM 001, Melles Griot, EEUU), utilizando un sensor de 0,5 cm de radio (área: 0,78 cm²). Las mediciones se realizaron por triplicado en varios puntos del estante y se determinó la posición en la cabina en que la irradiancia era uniforme.

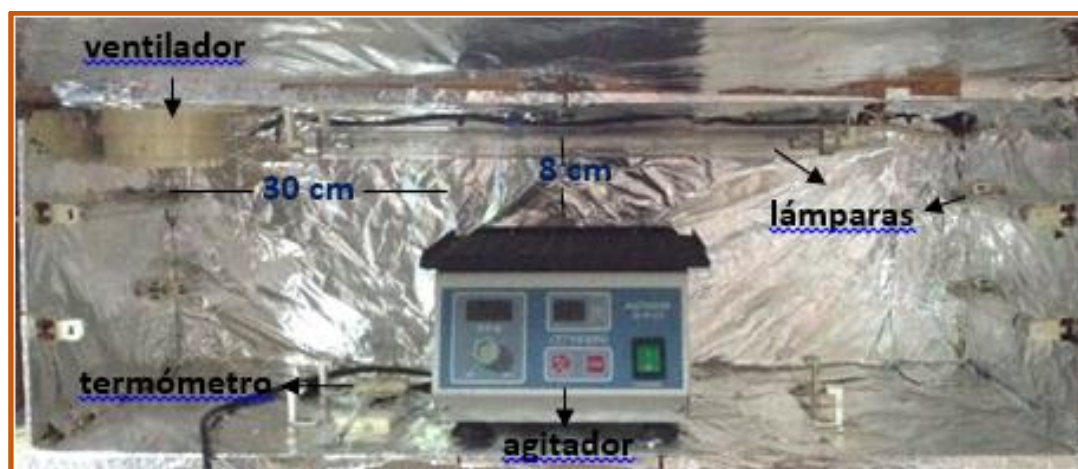


Figura 3-4-1. Cabina de radiación con luz UV-C.

3.4.3 Dosis de radiación UV-C

Los tiempos de exposición a la radiación UV-C utilizados en los ensayos fueron seleccionados teniendo en cuenta estudios previos realizados en el grupo. Los frutos se irradiaron durante 7, 11 y 15 min, correspondiendo los mismos a dosis de 5,3; 8,3 y 11,4 kJ/m².

Se utilizaron los siguientes controles: arándanos frescos recién llegados al laboratorio después de la cosecha (FF) y arándanos que fueron agitados durante 15 min en la cabina bajo las mismas condiciones operativas que los arándanos tratados, pero con las lámparas apagadas (control 0 kJ/m²).

3.5 Descontaminación de frutos por combinación de tratamientos con ozono en fase acuosa y luz UV-C.

Posterior al análisis de resultados de cada uno de los tratamientos aplicados en forma individual y con el objeto de evaluar un posible sinergismo o aditividad en la combinación de los tratamientos de ozono y luz UV-C se establecieron las concentraciones y tiempos de tratamiento a ensayar. La combinación de los tratamientos se realizó para tratar un grupo de frutos en la secuencia ozono y posterior exposición a luz UV-C y otro grupo de frutos en orden inverso. Se tomaron como controles frutos frescos (FF).

3.6 Almacenamiento de los frutos sujetos a tratamientos de descontaminación.

Las muestras tratadas con ozono en fase acuosa o luz UV-C y las muestras control (FF y los controles correspondientes a cada tratamiento) fueron almacenadas en bandejas plásticas de polipropileno de alta densidad con tapa permeables al aire (26 cm x 19 cm x 6 cm) a 4 ± 1 °C y 8 ± 1 °C, respectivamente; durante períodos de 0, 5, 10 y 15 días. Sólo para los estudios de la microbiota nativa el período de almacenamiento se extendió hasta los 20 días. En el caso de los tratamientos combinados el almacenamiento se realizó a la misma temperatura que los frutos tratados con luz UV-C (8 ± 1 °C) durante los mismos periodos de almacenamiento. Cada bandeja contenía 30 frutos.

Durante el almacenamiento, la humedad relativa se mantenía en aproximadamente 90 %. (PM6252B, Peakmeter, China). Se evaluó el desarrollo de la **microbiota** del fruto, **parámetros de calidad** (pH, acidez, sólidos solubles, humedad, propiedades mecánicas,

pérdida de peso, parámetros y funciones colorimétricas), **características microestructurales** y algunos **componentes bioactivos** (antocianinas, fenoles) y **capacidad antioxidante**.

3.7 Estudios sobre el desarrollo microbiano en los frutos de arándano

Se evaluó el efecto de los tratamientos de ozono en fase acuosa, luz UV-C, sus combinaciones y su posterior almacenamiento sobre la **micobiota nativa** presente en los frutos de arándano y sobre *Botrytis cinerea* BAFC 3003 inoculado superficialmente en la fruta.

3.7.1 Evaluación del desarrollo de la micobiota nativa (mohos)

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre la micobiota nativa de los frutos de arándano, los mismos no fueron sometidos a ningún tipo de lavado o desinfección previa; las muestras fueron tratadas tal cual arribaron del campo al laboratorio.

Una hora antes de su utilización los frutos fueron retirados del refrigerador para equilibrarlos a la temperatura ambiente. Posteriormente fueron sometidos a los diferentes tratamientos, ya sea ozono en fase acuosa, exposición a la luz UV-C o las combinaciones de ambos, y almacenados bajo las condiciones señaladas en el **ítem 3.6**. Los controles usados en la evaluación de la micobiota nativa fueron: FF, Control O₂ X min, control 0 kJ/m².

El desarrollo de micobiota nativa de las muestras tratadas y sin tratar (controles) se inspeccionó de forma visual sobre noventa frutos (por cada tratamiento), dispuestos en 3 bandejas (réplicas) con 30 frutos cada una. Las muestras fueron evaluadas diariamente durante 20 días de almacenamiento. Aquel fruto donde se presentó un mínimo crecimiento fúngico se consideró como fruto infectado y se descartó inmediatamente. Los resultados fueron expresados como número de frutos infectados por cada 100 frutos observados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$FI (\%) = \frac{f_t}{f_o} \cdot 100 \quad (3-2)$$

donde:

FI (%) = porcentaje de frutos infectados; f_o= número de frutos frescos en el día 0, f_t = número de frutos infectados a un tiempo t.

3.7.2 Evaluación del desarrollo de *Botrytis cinerea*

Preparación de la suspensión de conidios de *B. cinerea*

Se utilizó la cepa de *B. cinerea* BAFC 3003 provista por el Instituto de Micología y Botánica (InMiBo) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los conidios fueron obtenidos a partir del cultivo de la cepa en agar extracto de malta (AEM), incubado durante 14 días a 25 °C, al cabo de los cuales se cosecharon los conidios por suspensión en agua peptonada (0,1 % p/v) y Tween 80 (0,05 % v/v). La concentración de conidios fue de aproximadamente 10^7 conidios/mL; el recuento fue realizado utilizando una cámara de Neubauer (Exacta, Alemania).

Inoculación de *B. cinerea* en los frutos de arándano

Es importante mencionar que antes de llegar a la técnica descripta a continuación se realizó la puesta a punto de la inoculación de *B. cinerea* en el arándano. Para ello se probaron distintas variables, a saber:

- Desinfección con alcohol al 75 % v/v o con hipoclorito de sodio (200 ppm).
- Concentración inicial de conidios (10^4 y 10^7 conidios/mL) y volumen de suspensión (5, 10, y 20 μ L).
- Inoculación sobre la zona de inserción del pedúnculo o por inmersión de los frutos, con y sin heridas en el fruto.

En base a estos estudios, para la inoculación con *B. cinerea* BAFC 3003, los frutos inicialmente fueron lavados con agua destilada, desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm), enjuagados con agua estéril y secados inmediatamente con papel absorbente. Posteriormente, en una cabina de flujo estéril los frutos desinfectados fueron inoculados en la zona de inserción del pedúnculo con 10 μ L de la suspensión de conidios (10^7 conidios/mL) (**Figura 3-7-1 a**). Antes de la inoculación se realizó una micro-herida con el *tip* de la micropipeta en la zona mencionada. Los arándanos inoculados fueron secados a 21 ± 1 °C durante 2 h en la cabina de flujo estéril y luego se guardaron en un área limpia durante la noche a la misma temperatura para facilitar la adhesión del microorganismo (**Figura 3-7-1 b**).

Finalmente, una vez adherido el hongo (*B. cinerea*), los frutos fueron tratados con ozono en fase acuosa, luz UV-C o sus combinaciones y almacenados bajo las condiciones señaladas

en el **ítem 3.6**. En este caso se utilizó como controles para los tratamientos de ozono: frutos que fueron solamente inoculados ($FF_{(B.c)}$), frutos inoculados y sumergidos en agua destilada burbujeada con O_2 a diferentes tiempos ($Control_{(B.c)} O_2 X \text{ min}$); y como control para los tratamientos con luz UV-C, frutos solamente inoculados ($FF_{(B.c)}$). Adicionalmente, un grupo de frutos inoculado fue incubado a $21 \pm 1^\circ C$ en una estufa de convección forzada (P. Selecta S.A, España) para evaluar el crecimiento del hongo en condiciones favorables ($FF_{(B.c)}^*$).

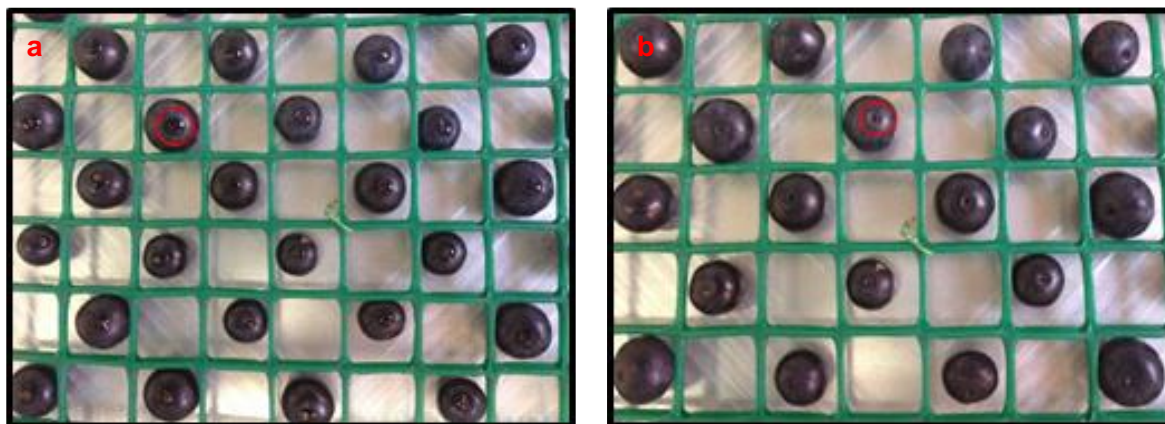


Figura 3-7-1. Frutos de arándano inoculados superficialmente con *B. cinerea*. a) arándano inoculado, b) inóculo adherido al fruto.

3.8 Evaluación de parámetros de calidad

3.8.1 Determinación de pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad

Determinación de pH

Para la medición de pH se utilizó un pHmetro PerpHectLogRmeter modelo 310 (Orion, EEUU). Las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento utilizando purés elaborados con 10 frutos c/u. Antes de cada análisis, el pHmetro fue calibrado con soluciones buffer de pH 7,0 y pH 4,0.

Determinación de acidez titulable

La acidez titulable fue determinada por el método de titulación potenciométrico (AOAC, 2005). Se homogenizó 5 g de muestra con 50 mL de agua destilada previamente calentada a $80^\circ C$ durante 30 min; posteriormente para separar la pulpa, el homogenizado fue

filtrado utilizando gasa estéril. La solución remanente se tituló con NaOH (0,1N) hasta alcanzar un valor de pH final de $8,2 \pm 0,1$. Las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento. El resultado fue expresado en gramos de ácido cítrico presente en 100 g de pulpa de fruta (% p/p), de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ de Acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot P_{\text{Meq ácido cítrico}} \cdot 100}{P_{\text{muestra}}} \quad (3-3)$$

donde:

V_{NaOH} (mL) = volumen NaOH gastado para alcanzar un pH final de $8,2 \pm 0,1$; N_{NaOH} = normalidad del NaOH (0,1N); P_{Meq} de ácido cítrico = peso miliequivalente del ácido cítrico (0,064) y P_{muestra} (g) = peso de la muestra.

Determinación del contenido de sólidos solubles (SS)

La concentración de sólidos solubles (°Brix) fue determinada en un refractómetro digital modelo PR-101 (ATAGO, Japón), calibrado previamente con agua destilada. Las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento utilizando purés elaborados con 10 frutos c/u.

Determinación de humedad

La humedad de las muestras control y tratadas se determinó gravimétricamente por triplicado en una estufa de secado a vacío a 65 ± 1 °C (Sanyo Gallenkamp, Reino Unido) hasta peso constante ($< 0,0001$ g) utilizando cloruro de calcio como desecante. Los valores obtenidos se expresaron como contenido de agua en gramos por gramo de masa seca (m, g H₂O/g m.s). Las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento utilizando purés elaborados con 10 frutos c/u.

3.8.2 Medición de las propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las muestras se evaluaron mediante ensayos de penetración utilizando un Texturómetro Universal modelo 3345 (Instron, EEUU). Los frutos fueron dispuestos sobre un soporte que consistió en una base de aluminio con un hueco en el centro,

de manera tal que facilitara la punción sobre la zona ecuatorial (perpendicular a la zona de abscisión) de cada uno de los frutos.

Para la obtención de las curvas fuerza-desplazamiento se utilizó una velocidad constante del cabezal de 50 mm/min; un rango de carga de 50 N; una distancia de recorrido del punzón de 10 mm y una punta con diámetro de 3 mm. Se realizaron 30 mediciones para cada condición inmediatamente después del tratamiento y durante el almacenamiento, a una temperatura de 25 ± 2 °C. Se registró la fuerza máxima de ruptura (F_R), la deformación correspondiente a la F_R (D_R), el trabajo para lograr la ruptura (W) y la “rigidez” (R_i).

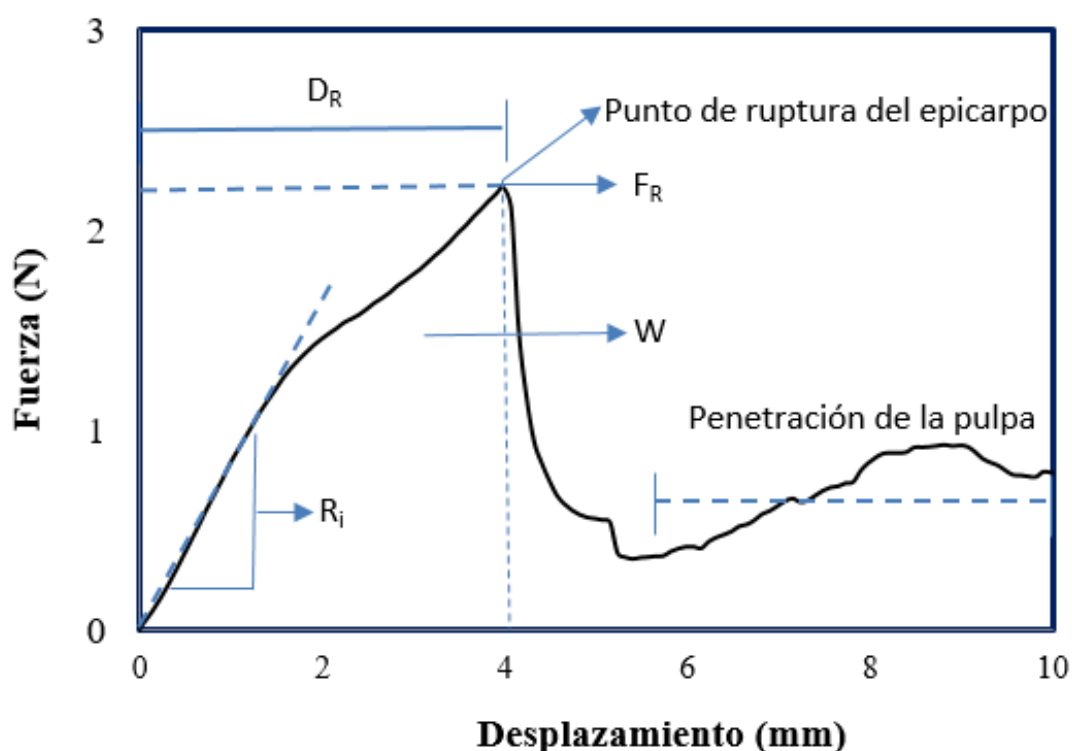


Figura 3-8-1. Curva típica de penetración de los frutos de arándano.

- *Fuerza máxima de ruptura (F_R):* definida como el valor de la fuerza medida en Newton (N) necesaria para producir la ruptura de la superficie de la baya; corresponde al punto máximo de la curva. Esta fuerza corresponde al punto de ruptura del epicarpo y representa la dureza del mismo (Camps y col., 2005).

- *Desplazamiento correspondiente a la F_R (D_R):* se define como el desplazamiento de la punta (expresado en mm) hasta el momento de la ruptura del epicarpo; permite calcular la deformación del fruto antes de la ruptura del epicarpo.

- *El trabajo (W)*: se estima como el área bajo la curva fuerza-desplazamiento desde el momento inicial en que la punta del punzón toca la baya hasta que se rompe el epicarpo. Es medido en mili Joule (mJ) ó Newton por milímetro (N.mm), y es un índice de la energía necesaria para romper la baya.

- *“Rigidez” (R_i)*: expresada en N/mm, corresponde a la pendiente de la curva fuerza-desplazamiento, medida desde el origen hasta aproximadamente el 30 o 40 % de la deformación (rango lineal).

3.8.3 Determinación de la pérdida de peso

La pérdida de peso (PP) de los frutos de arándano fresco y tratados se evaluó midiendo el peso de los mismos en el día 0, 5, 10 y 15 de almacenamiento. El peso de las muestras fue registrado en una balanza Adventurer HOAUS modelo ARA520 (Ohaus Corp., EEUU) con una precisión de $\pm 0,01$ g. Se evaluó la PP en 30 frutos para cada condición. Los resultados fueron expresados como porcentaje de variación de peso con respecto al de la muestra fresca o tratada en el día 0, según la siguiente ecuación:

$$PP (\%) = \frac{100 \cdot (p_o - p_t)}{p_o} \quad (3-4)$$

donde:

PP (%) = porcentaje de pérdida de peso de la muestra; p_o = peso inicial de la muestra al día 0, p_t = peso de la muestra a un tiempo t.

3.8.4 Evaluación de los parámetros y funciones colorimétricas

El color de los frutos de arándano de los distintos lotes (frutos tratados con ozono en fase acuosa, luz UV-C y la combinación de éstos) fue medido con diferentes equipos debido a que, durante el desarrollo de esta tesis, el colorímetro que se empleó inicialmente quedó fuera de uso.

El color de los frutos tratados con ozono fue medido con un espectrofotómetro triestímulo de reflectancia con esfera integradora modelo CM-508-d (Minolta Co, Japón), con una apertura de medida de 1,1 cm de diámetro, iluminante D65 y un ángulo de observación de 2°. Debido a

que el equipo antes mencionado dejó de operar, el color de los frutos tratados con luz UV-C y los frutos tratados con la combinación O₃-UV-C (o viceversa) fue evaluado con un colorímetro triestímulo de reflectancia con esfera integradora modelo CM-700-d (Minolta Co, Japón), usando una apertura de 0,5 cm. El iluminante y el ángulo de observación fueron iguales que en el primer equipo mencionado.

Se usaron 30 muestras independientes para cada tratamiento y las mediciones fueron realizadas en dos posiciones de la zona ecuatorial del fruto. Luego se calculó el valor promedio para cada uno.

Se registraron los valores de las coordenadas de color del espacio CIE (X, Y, Z) y los parámetro L^* , a^* y b^* del espacio CIELab, donde L^* indica luminosidad, a^* indica cromaticidad sobre el eje que va del rojo (+) al verde (-) y b^* indica cromaticidad sobre el eje que va desde el amarillo (+) hasta el azul (-) (**Figura 3-8-2**). A partir de estos valores numéricos, se calcularon las funciones de color “croma” (C^*) y “ángulo de tono” (h), utilizando las siguientes ecuaciones:

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3-5)$$

$$h_{ab} = \arctg(b^*/a^*) \quad (3-6)$$

El ángulo de tono h se ubica en la circunferencia de 360°; puede encontrarse en uno de los cuatro cuadrantes del plano a^*b^* ; el valor 0° está definido por el rojo-púrpura, 90° por el color amarillo, 180° por el color verde y finalmente 270° por el color azul. C^* representa la pureza de tono (saturación) y se puede distribuir en los cuatro cuadrantes del plano a^*b^* ; sus valores van desde 0 en el centro (gris neutro) hasta 100 en los bordes (más saturado) (**Figura 3-8-2**).

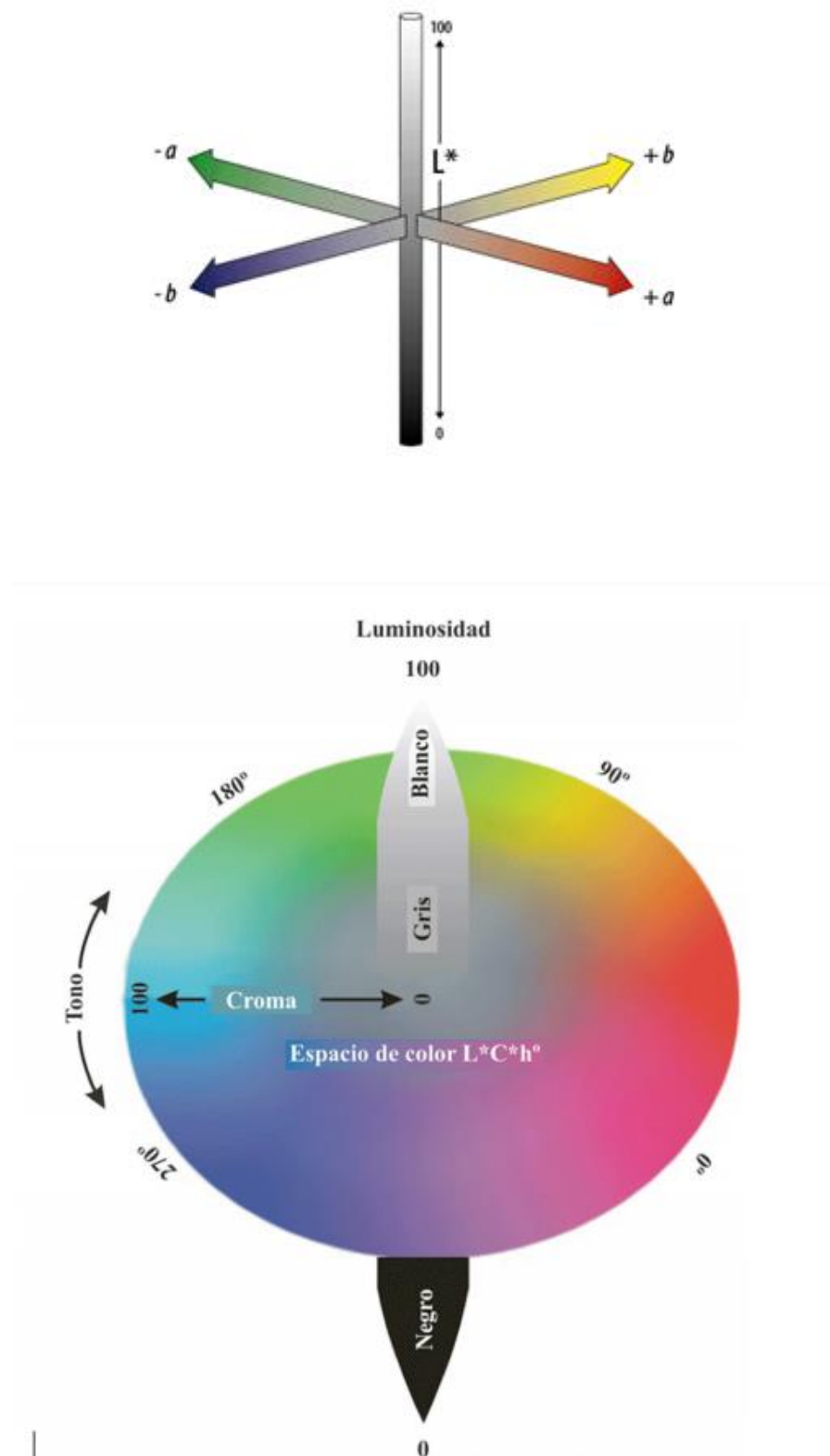


Figura 3-8-2. Representación del espacio de color CIE- $L^*a^*b^*$ y CIE $L^*C^*h^°$.

3.9 Evaluación de compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante del arándano.

3.9.1 Extracción de los compuestos bioactivos

Con el objeto de definir el mejor método de extracción, se modularon diferentes variables haciendo ligeras modificaciones a las técnicas descriptas por Rios de Souza y col. (2014) y Giovanelli y Buratti (2009):

- Solvente de extracción (SE), relación etanol/agua (v/v): 50:50, 80:20, 90:10
- Adición de otro SE: Acetona/agua (70:30, v/v)
- pH de la SE, mediante la adición de HCL al 0,01 y 0,1 % v/v.

Luego de realizar las diferentes pruebas y evaluar los resultados, se definió la técnica descripta a continuación.

La extracción de antocianinas, fenoles y compuestos antioxidantes del tejido de arándano se llevó a cabo con una solución de extracción (SE) que contenía etanol: agua (90:10 v/v) y HCL 0,01 % v/v. Para la extracción fueron necesarias cuatro etapas: **Etapla 1.** Se trituraron varios frutos en un equipo Ultraturrax T25B (IKA, EEUU) hasta obtener un puré homogéneo (aproximadamente 6 frutos por c/réplica), en un tubo falcón totalmente cubierto con papel aluminio para proteger de la luz y el oxígeno; se adicionó 1,5 g del puré y 15 mL de SE, se agitó durante 60 min en un agitador orbital (Decalab S.R.L, Argentina) a temperatura ambiente. Se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4 ± 1 °C en una centrífuga modelo 5804R (Eppendorf AG, Alemania), y luego se separó el sobrenadante del residuo. **Etapla 2.** Al residuo de la etapa uno se añadió 15 mL más de SE, se agitó durante 15 min más y se centrifugó en las mismas condiciones de la etapa 1, nuevamente el sobrenadante fue separado del residuo y juntado con el sobrenadante de la etapa anterior. **Etapla 3.** Se añadió 15 mL más de SE al residuo y se procedió de igual forma que la etapa 2 hasta separar el sobrenadante del residuo. El sobrenadante fue reunido al de las etapas anteriores. **Etapla 4.** Finalmente al residuo de la etapa 3 se añadió 45 mL de solución extractora: acetona/agua (70:30, v/v), se agitó durante 60 min más, posteriormente se centrifugó en las condiciones antes mencionadas y el residuo fue separado del sobrenadante. Los sobrenadantes obtenidos en las etapas 1, 2, 3 y 4 (90 mL) fueron mezclados hasta homogeneizarse y luego filtrados en gasa estéril para eliminar cualquier residuo que hubiera podido pasar en los sobrenadantes obtenidos en cada etapa. Este extracto

resultante fue usado para medir antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Los extractos fueron obtenidos por quintuplicado para cada condición.

3.9.2 Medición del contenido de antocianinas

El contenido de antocianinas fue determinado de acuerdo al método espectrofotométrico de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Los extractos en frascos acaramelados (obtenidos en el **ítem 3.8.5.1**) fueron diluidos (1/10) en soluciones amortiguadoras de cloruro de potasio (0,025 M, pH 1,0) y acetato de sodio (0,4 M, pH 4,5). Se agitaron en un vortex ZX-classic (VELP, Europa) y se dejaron reposar por 15 min protegiendo de la luz y el oxígeno. Posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) a una longitud de onda de 510 nm y 700 nm. El contenido de antocianinas se obtuvo de acuerdo a la **ecuación 3-7** y sus valores fueron expresados en miligramos de cianidina-3-glucósido presentes en 100 g de masa seca (mg cia-3-glu/100 g m.s). Se analizaron 5 extractos por cada condición y el contenido de antocianinas en cada extracto se midió por triplicado, informándose el valor promedio para cada uno.

$$\text{Antocianinas} = \frac{[(A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}] \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (3-7)$$

donde:

A = absorbancia, MW = peso molecular de pelargonidina-3-glucósido (433 g/mol), DF = factor de dilución (1/10), ϵ = coeficiente de extinción molar de pelargonidina-3-glucósido disuelta en medio buffer pH 1,0 (15600 L.mol⁻¹.cm⁻¹) (Giusti y Wrolstad, 2001), l = longitud de la celda (1 cm).

3.9.3 Medición de los compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin Ciocalteu utilizando la técnica microadaptada descrita por Slinkard y Singleton (1977). En un frasco acaramelado (capacidad 5 mL) se mezclaron 0,2 mL del extracto (obtenido en el punto **3.8.5.1**) con 2,6 mL de agua destilada y 0,2 mL del reactivo Folin - Ciocalteu (FCR), la mezcla se agitó en un vortex ZX- classic (VELP, Europa) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 min protegiendo las muestras de la luz y el oxígeno. Transcurrido este tiempo se adicionó 2 mL de carbonato de sodio 15 % p/v, se agitó nuevamente en el vortex y se dejó reposar

nuevamente a temperatura ambiente y en oscuridad por 90 min. Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla a 760 nm en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón). Las mediciones fueron realizadas por quintuplicado por cada condición y cada extracto se midió por duplicado (luego se calculó el valor promedio para cada uno).

El contenido de fenoles totales fue informado como mg de equivalentes de ácido gálico presente en 100 g de masa seca (mg EAG/100 g m.s). Las concentraciones de fenoles totales se obtuvieron comparando las curvas de calibración realizadas con ácido gálico (1-8 mg/L, $R^2=0,996$).

3.9.4 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de los extractos obtenidos en el punto 3.8.5.1 se determinó por dos métodos: **ABTS** (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfónico) y **ORAC** (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno).

ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfónico)

La determinación de la CA por el método de ABTS se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Re y col. (1999) con ligeras modificaciones.

Para generar el radical libre catiónico $ABTS^{•+}$ se utilizó ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfónico) 7 mM con una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) 2.45 mM (concentración final), se incubó a temperatura ambiente ($< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{•+}$ se diluyó en buffer fosfato pH 7,40 hasta una absorbancia de $1,00 \pm 0,01$ a 734 nm (dilución 1:50). Se mezcló en frascos acaramelados 80 μL de extracto con 7,92 mL de la solución diluida de $ABTS^{•+}$; esta mezcla se agitó e incubó durante 2 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño termostático modelo Masson (Vicking, Argentina). Los tiempos adecuados de incubación de las soluciones de trolox así como el de las muestras fueron establecidos en base a un estudio previo de cinética de incubación.

Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) a una longitud de onda de 734 nm. La CA de las muestras se obtuvo de acuerdo a las **ecuación 3-8 y 3-9** y los resultados fueron expresados como mili moles equivalentes de Trolox por 100 gramos de masa seca (mM ET/100 g m.s). Se utilizaron soluciones de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilchroman-2-carboxílico) entre 6 y 17 μM para construir la curva de calibración ($R^2 = 0,99$). Para determinar el porcentaje de inhibición de cada uno de estos puntos

se procedió de la misma forma que en las muestras, excepto que el tiempo de incubación de los puntos de la curva de calibración fue de 30 min. Para realizar el blanco, en lugar de muestra o trolox, se utilizó 80 µL de buffer fosfato pH 7,40 y la absorbancia fue medida al minuto uno y después de 2 h de incubación. Las mediciones fueron realizadas por quintuplicado para cada condición y cada extracto se midió por duplicado (luego se calculó el valor promedio para cada uno).

$$\% \text{ Inhibición}_{\text{blanco}} = \frac{\text{Abs}_{1\text{min}} - \text{Abs}_{120\text{min}}}{\text{Abs}_{1\text{min}}} \cdot 100 \quad (3-8)$$

$$\% \text{ Inhibición}_{\text{muestra}} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{blanco}1\text{min}} - \text{Abs}_{\text{muestra}120\text{min}}}{\text{Abs}_{\text{blanco}1\text{min}}} \cdot 100 \right] - \% \text{ Inhibición}_{\text{blanco}} \quad (3-9)$$

ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)

El método de ORAC convencional ha sido diseñado para usar sistemas automáticos (Huang y col., 2002). Dávalos y col. (2004) proponen una adaptación de la técnica convencional con un sistema manual para aquellos laboratorios que no cuenten con dichos sistemas. Por tanto, la determinación de CA por el método ORAC se realizó de acuerdo a este último método mencionado. Este método usa la fluoresceína como sonda fluorescente.

Los extractos fueron diluidos en diferentes concentraciones (diluciones: 1:80, 1:160), utilizando una solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). Se analizaron 5 muestras por cada condición y en cada muestra todas las diluciones se realizaron por duplicado.

Las determinaciones se llevaron a cabo en un luminómetro Victor³ Multilabel-1420 (Perkin Elmer, Estados Unidos) sobre microplacas de poliestireno negras de 96 pocillos, de fondo plano y superficie sin tratamiento (Corning, Estados Unidos). En cada pocillo se adicionó 115 µL de fluoresceína ($8,16 \cdot 10^{-5}$ mM) disuelta en solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4) y 25 µL de muestra diluida. La mezcla se incubó en agitación dentro del luminómetro durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 60 µL de AAPH ((2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorado) (153 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). Se agitó la microplaca e inmediatamente se transfirió al lector donde se midió la fluorescencia de la mezcla a 37 °C durante 66 min, registrando lecturas en cada pocillo cada 40 s. Las lecturas se realizaron empleando filtros de emisión y excitación de 520 nm y 485 nm, respectivamente. El equipo fue programado para

agitar automáticamente la microplaca durante el periodo de lectura. Para realizar el blanco, en vez de la muestra se adicionó 25 μL de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4). La curva de calibración fue realizada utilizando como estándar Trolox en diferentes concentraciones (3,13; 6,25; 12,50; 25,00 37,50 y 50,00 μM), obteniéndose en todas las curvas valores de R^2 de aprox. 0,98 y 0,99. Las mediciones para cada concentración del estándar se realizaron por duplicado.

Se calcularon los valores del área bajo la curva de fluorescencia (AUC) obtenida para el blanco, las muestras y los estándares, mediante el método de integración numérica del trapecio, de acuerdo a la **ecuación 3-10**:

$$\text{AUC} = \left(0,5 \frac{f_0}{f_0} + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_{98}}{f_0} + \frac{0,5 f_{99}}{f_0} \right) \cdot 0,667 \quad (3-10)$$

donde:

f_0 = lectura inicial de la fluorescencia, f_i = lectura de la fluorescencia a tiempo i , 0,667: tiempo en minutos que tardaba el equipo en medir todas las muestras y volver a medir la muestra en la primera celda.

El área bajo la curva neta (AUC neta) de las muestras y los estándares se obtuvo sustrayendo la AUC de las mismas con el área bajo la curva del blanco (**Figura 3-9-1**).

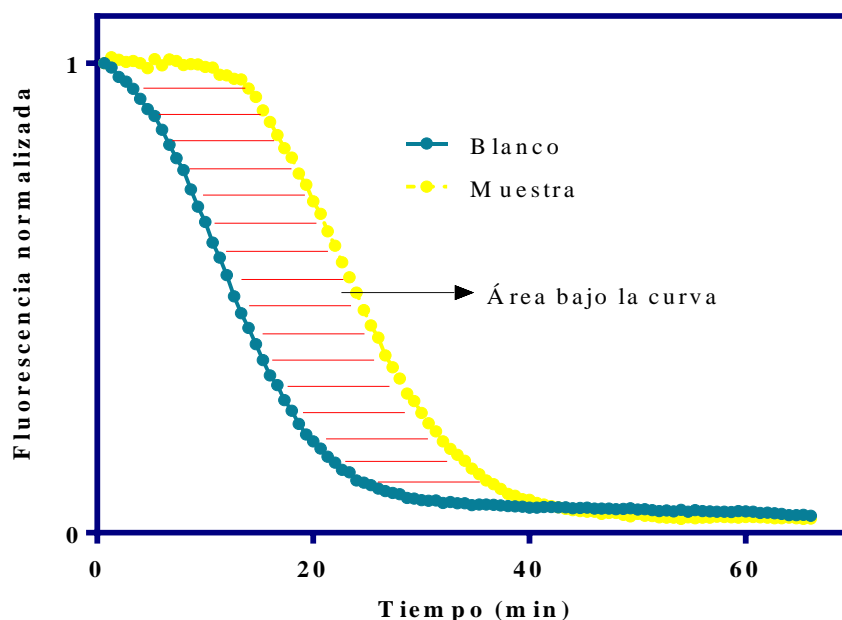


Figura 3-9-1 Ilustración del cálculo del valor ORAC expresado como el área neta bajo la curva.

La curva de calibración se obtuvo graficando las concentraciones de Trolox con la correspondiente área bajo la curva neta (AUC), obtenida para cada concentración de estándar. Los valores finales ORAC se calcularon utilizando la ecuación de regresión de la curva de calibración, y se expresaron como mili moles equivalentes de Trolox por 100 g de masa seca (mM ET/100 g m.s).

3.10 Observación de la micro y ultraestructura

Las muestras de frutos de arándano, incluyendo el epicarpo y una porción del mesocarpo, fueron procesadas mediante la aplicación de las técnicas histológicas convencionales para su observación con microscopio óptico (MO) y microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA). Los estudios anatómicos con el MO se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Vegetal del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Las observaciones con el MEBA se realizaron en la sede central del Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Buenos Aires.

3.10.1 Microscopía óptica

Las muestras de arándano (control) y las tratadas se cortaron con una hoja de afeitar en forma de pequeños gajos, teniendo cuidado que la parte externa de los mismos (epicarpo del fruto) tuviera al menos 2 mm de ancho y de profundidad (porción del mesocarpo del fruto) aproximadamente 3 mm. Las secciones obtenidas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído 3 % v/v preparada en buffer fosfato de potasio (20 mM), pH 7,4 a 4 - 5 °C durante 48 h. Luego fueron lavadas con solución buffer fosfato de potasio (0,1 M; pH 7,4) y vueltas a fijar en solución acuosa de OsO₄ 1,5 % p/v a 20 °C durante 2 h. Posteriormente fueron deshidratadas con una serie de soluciones sucesivas de concentración ascendente de acetona y embebidas en resina Spurr de baja viscosidad. A partir de las muestras incluidas en resina Spurr se obtuvieron secciones de 1 µm de grosor que fueron teñidas con azul de toluidina y examinadas en un microscopio Zeiss Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.10.2 Microscopía electrónica ambiental de barrido

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental, Philips XL 30 (Holanda). Las muestras de arándano FF, control y las tratadas, sin preparación previa, fueron colocadas en el porta muestras del equipo en la modalidad bajo vacío, a una presión de 0,9 torr y una aceleración de voltaje de 20,0 kV (**Figura 3-10-1**). El detector del equipo para obtener las imágenes topográficas de la superficie de cada uno de los frutos fue del tipo BSE (*solid-state backscattered electron*).

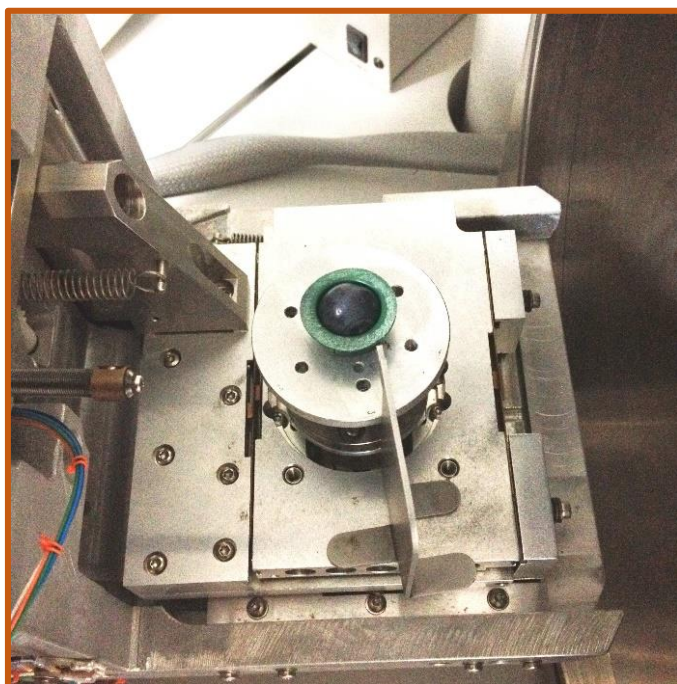


Figura 3-10-1. Portamuestra del microscopio electrónico de barrido ambiental, Philips XL 30, conteniendo un fruto de arándano.

3.11 Análisis estadístico de los datos

Antes de desarrollar los análisis se comprobó la presunción de la homogeneidad de las matrices de varianza – covarianza (Prueba de Homocedasticidad) y la distribución normal (Prueba Shapiro-Wilks modificada) de los residuos. En algunos casos se realizó transformaciones de raíz cuadrada o arcoseno (raíz (p)) de las variables, de manera que los datos cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

La correlación entre las variables respuesta para algunos casos se evaluó por la matriz de correlación de Pearson (análisis paramétrico) y/o mediante el análisis de Spearman (análisis no paramétrico).

Los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar y se analizaron utilizando el software estadístico Infostat v.2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Los valores de concentración de sólidos solubles, pH, acidez titulable (AT), humedad, respuesta microbiana, antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante fueron analizados a través de un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) para buscar diferencias significativas entre los tratamientos. Se aplicó un test *a posteriori* de comparación de medias Tukey (con un nivel de confianza del 95 %) cuando se encontraron diferencias significativas.

Los efectos de los tratamientos de ozono y de luz UV-C a lo largo del tiempo sobre el porcentaje de pérdida de peso de arándanos y variables y funciones colorimétricas fueron comparados por modelos lineales generales mixtos (GLMMs). Cada modelo incluyó 2 factores fijos: tratamientos de ozono (5 niveles como factor entre sujetos) o de luz UV-C (3 niveles como factor entre sujetos) y tiempo (0, 5, 10 y 15 días para color y 5, 10 y 15 días para porcentaje de pérdida de peso, considerados como factor dentro de sujetos). Los arándanos individuales fueron incluidos en el análisis como factor aleatorio. Las comparaciones entre promedios de efectos principales o de términos de interacción se realizaron usando el test de LSD Fisher cuando se detectaron diferencias significativas. Los modelos seleccionados fueron aquellos que presentaron menor valor de AIC (Criterio de Información de Akaike). Este criterio permite identificar el modelo que explique la mayor variación en el porcentaje de pérdida de peso y color en arándanos con la menor cantidad de parámetros a estimar. El análisis GLMM se realizó utilizando la función lme (paquete lme4, R Development Core Team, 2014). El análisis se realizó con R 3.0.3 (R Development Core Team, 2014). Se verificaron las suposiciones del mejor modelo; los residuos se distribuyeron normalmente, pero las varianzas no fueron homogéneas. Para cada variable de respuesta, se seleccionó la estructura de varianza más adecuada del residuo utilizando la opción VarExp, VarIdent o VarPower (paquete nlme) para corregir la heterogeneidad de las varianzas entre tratamientos.

Los valores atípicos obtenidos cuando fue analizado el comportamiento reológico de los frutos fueron detectados por medio de la distancia Mahalanobis D2 ($p \leq 0,001$) utilizando el software SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., Estados Unidos) y retirados del conjunto de datos destinados al análisis. Dichos resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para buscar diferencias significativas entre las muestras. Se realizaron *a posteriori* comparaciones múltiples entre las medias multivariadas de los tratamientos mediante la prueba de Hotelling corregido por Bonferroni (con un nivel de confianza del 95 %) cuando se encontraron diferencias significativas. Para apoyar los resultados

obtenidos con el análisis de la varianza multivariado se aplicó un análisis de función discriminante (AFD), a partir del cual se obtuvieron un cierto número de funciones como resultado de combinaciones lineales de las variables originales involucradas. Solo aquellas variables que no correlacionaron se ingresaron a la tabla de datos para ser analizadas por MANOVA y AFD.



4. RESULTADOS

4.1 APLICACIÓN DE OZONO EN FASE ACUOSA

4.1.1 Determinación de la concentración de ozono en la fase acuosa.

La concentración de ozono disuelto en la fase acuosa fue determinada según el método colorimétrico Índigo (ítem 3.3.2). En la **Figura 4-1-1** se muestra la concentración de ozono disuelto en agua destilada (con y sin arándanos) burbujeada con ozono a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

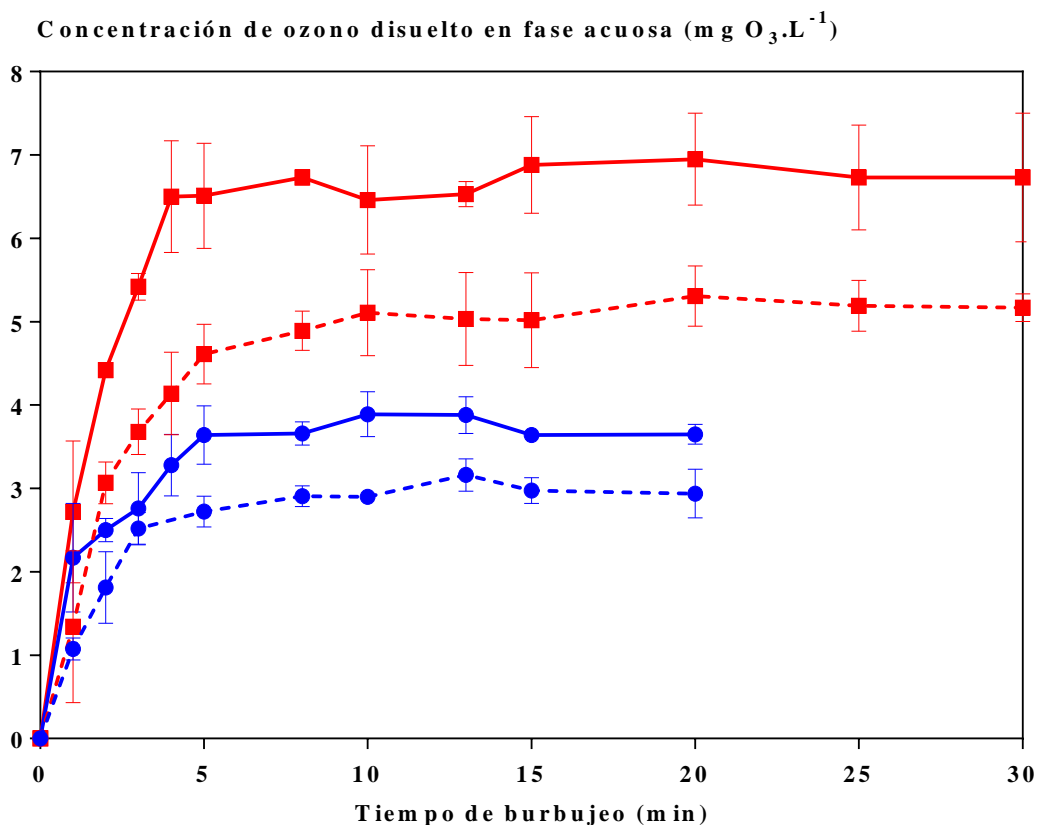


Figura 4-1-1. Concentración de ozono disuelto en agua burbujeada con diferentes concentraciones de ozono en el gas de entrada ($10 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (●) y $18 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (■)) a la columna de burbujeo y diferentes tiempos de exposición a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Agua destilada con frutos de arándano (---); agua destilada sin fruta (—). Los valores son el promedio de tres réplicas ($n = 3$) y las barras verticales representan la desviación estándar.

La concentración de ozono fue mayor en el agua destilada sin frutos que en el agua destilada con el agregado de frutos de arándano, para ambas concentraciones de ozono gaseoso en la

corriente de entrada a la columna de burbujeo ensayadas. Estos resultados sugieren una interacción del ozono con la materia orgánica y algunos microorganismos presentes en los frutos, ya que la concentración de ozono disminuyó en presencia de los mismos.

Después de 5 minutos de burbujeo con ozono gaseoso con una concentración de 10 ± 2 y 18 ± 2 mg O₃.L⁻¹, la concentración de ozono disuelto en la fase acuosa en presencia de arándanos fue de $3,0 \pm 0,2$ y $5,1 \pm 0,3$ mg O₃.L⁻¹, respectivamente. Para los ensayos realizados con agua destilada en ausencia de fruta la concentración fue de $3,7 \pm 0,2$ y $6,7 \pm 0,4$ mg O₃.L⁻¹, respectivamente. En ambos casos, la concentración de ozono en agua se incrementó durante los primeros 5 min, permaneciendo luego prácticamente constante para tiempos mayores. En la tesis se hará referencia a los niveles de ozono disuelto en la fase estacionaria.

4.1.2 Evaluación de la respuesta microbiana

Para evaluar la efectividad de los tratamientos de ozono aplicados a los frutos de arándano se analizó la respuesta de la micobiota nativa y de conidios de *Botrytis cinerea* inoculados en los frutos. Los frutos control y los tratados luego fueron almacenados durante 20 días (micobiota nativa) y 15 días (*B. cinerea*) a 4 ± 1 °C.

4.1.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa

El desarrollo de la micobiota nativa de las muestras tratadas y sin tratar durante el almacenamiento fue realizado por inspección visual. Las muestras fueron evaluadas diariamente durante todo el almacenamiento tal como se describió en el **ítem 3.7.1**. Con el objeto de evaluar la descontaminación por efecto *per se* del ozono, se realizaron controles burbujeando solamente oxígeno en el agua destilada, manteniendo el generador de ozono apagado, durante los mismos tiempos de exposición que para los frutos tratados con ozono.

La **Figura 4-1-2** muestra la evolución del porcentaje de frutos infectados [FI (%)] para los frutos frescos (FF), los diferentes controles y los frutos ozonizados.

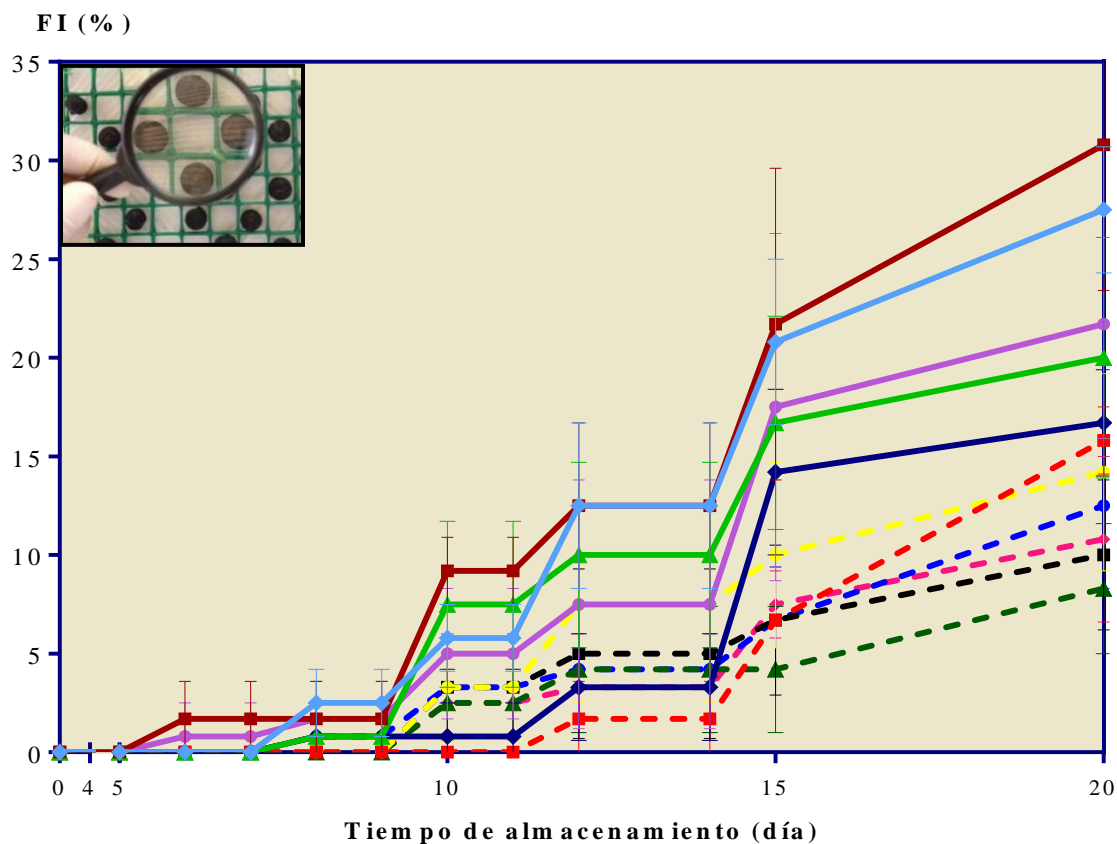


Figura 4-1-2. FI (%) con **micobiota nativa** de arándanos expuestos a distintas concentraciones de ozono y almacenados a 4 ± 1 °C durante 20 días. FF (◆); control O₂ 10 min (■); control O₂ 15 min (▲); control O₂ 20 min (●); control O₂ 30 min (◆); 3,0 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■); 3,0 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 15 min (▲); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 30 min (◆). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

La contaminación fúngica ocurrió principalmente en la zona de inserción del pedúnculo y mínimamente en la zona inferior del arándano (ambos lugares de difícil acceso para el ozono). Durante la inspección visual se observó para todos los tratamientos un efecto inhibitorio en el desarrollo fúngico en las muestras tratadas con ozono con respecto a la fruta fresca y a los controles correspondientes al tratamiento sólo con oxígeno.

La mayor parte de los tratamientos con ozono retrasaron el desarrollo fúngico en los frutos de arándano en al menos 2 días de almacenamiento respecto a los FF; solamente los frutos ozonizados con una concentración de 3,0 mg O₃.L⁻¹ durante 10 min retrasó 4 días la aparición de la infección. En lo que se refiere a los frutos ozonizados respecto a sus propios controles, el comportamiento fue similar. Las muestras ozonizadas con ambas concentraciones, 3,0 y 5,1 mg

O_3L^{-1} , presentaron infección a partir del día 10 de almacenamiento en su gran mayoría, excepto las muestras tratadas con $3,0 \text{ mg O}_3\text{L}^{-1}$ 10 min y $5,1 \text{ mg O}_3\text{L}^{-1}$ 20 min en las que, la infección de los frutos se detectó a partir del día 12 y 8 respectivamente (**Figura 4-1-2**).

Los FF y los controles tratados con O_2 durante 15 y 30 min presentaron infección a partir del día 8, mientras que los controles tratados con O_2 durante 10 y 20 min lo hicieron a partir del día 6 de almacenamiento.

En la **Tabla 4-1** se detallan los valores del FI (%) durante los 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento.

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre distintos tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Para cumplir con los supuestos de ANOVA (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas y covarianzas entre tratamientos) los datos fueron transformados a arcoseno ($\arcsin(\sqrt{p})$). El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{60, 165} = 1,33$; $p = 0,1100$), es decir, las diferencias entre tratamientos son independientes del tiempo de almacenamiento.

Al contrastar los tratamientos, en general el FI (%) fue significativamente menor ($F_{10, 165} = 20,09$; $p < 0,0001$) en las muestras tratadas con ozono que en las muestras control, excepto las muestras tratadas con oxígeno durante 30 min, en las cuales el porcentaje de infección no fue significativamente diferente al de las muestras ozonizadas.

No se observaron grandes diferencias en el valor FI (%) para las distintas concentraciones de ozono y sus diferentes tiempos de exposición: 5, 10, 15, 20 y 30 min. Sin embargo, en general, comparando ambas concentraciones, se observó que el tratamiento de $3,0 \text{ mg O}_3\text{L}^{-1}$ 20 min en fase acuosa fue el menos efectivo a partir del día 10 de almacenamiento. Los frutos ozonizados con $3,0 \text{ mg O}_3\text{L}^{-1}$ durante 10 min mostraron un comportamiento ligeramente diferente: la infección se presentó después de los 10 días de almacenamiento, pero luego el número de frutos infectados creció rápidamente y al final del periodo evaluado, los valores de FI (%) de estas muestras fueron en promedio los más altos entre los de las muestras ozonizadas.

Tabla 4-1. Valores medios del porcentaje de frutos infectados por la micobiota nativa en frutos frescos, controles y tratados con distintas concentraciones de ozono (3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹) a diferentes tiempos de exposición (10, 15, 20 y 30 min) y almacenados a 4 ± 1 °C durante 20 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)						Promedio Total
	0	5	10	15	20		
	FI (%) ± DE						
FF	ND	ND	5,8 ± 1,7	20,8 ± 4,2	27,5 ± 3,2	13,0 ± 11	a
Control O ₂ 10 min	ND	ND	9,2 ± 1,7	21,7 ± 7,9	30,8 ± 7,4	15,0 ± 11	a
Control O ₂ 15 min	ND	ND	7,5 ± 4,2	16,7 ± 5,4	20,0 ± 6,1	11,0 ± 8	a,b
Control O ₂ 20 min	ND	ND	5,0 ± 3,3	17,5 ± 8,8	21,7 ± 5,8	11,0 ± 9	a,b
Control O ₂ 30 min	ND	ND	0,8 ± 1,7	14,2 ± 4,2	16,7 ± 2,7	7,0 ± 8	c
3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	ND	ND	0,0 ± 0,0	6,7 ± 0,0	15,8 ± 2,7	4,0 ± 4	d
3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	ND	ND	3,3 ± 2,7	10,0 ± 2,7	14,2 ± 1,7	7,0 ± 6	b,c
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	ND	ND	3,3 ± 2,7	6,7 ± 3,8	10,0 ± 3,8	5,0 ± 5	c,d
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 15 min	ND	ND	2,5 ± 1,7	4,2 ± 3,2	8,3 ± 3,3	4,0 ± 4	c,d
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	ND	ND	3,3 ± 2,7	6,7 ± 2,7	12,5 ± 4,2	6,0 ± 5	c,d
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 30 min	ND	ND	2,5 ± 1,7	7,5 ± 1,7	10,8 ± 4,2	5,0 ± 5	c,d
Promedio Total			4,0 ± 4,0	12,0 ± 8,0	17,0 ± 9,0		
			A	B	C		

ND: visualmente sin desarrollo.

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas (p<0,05) entre días de almacenamiento.

Todos los períodos de tiempo de almacenamiento analizados resultaron significativamente diferentes entre sí ($F_{6, 165} = 148,0$; $p < 0, 0001$); el porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentaron los días de almacenamiento, siendo los FF y el control O₂ 10 min los que mayor porcentaje de frutos infectados presentaron durante todo el almacenamiento.

A pesar que el análisis estadístico no encontró diferencias significativas entre las diferentes muestras control (excepto control O₂ 30 min), es evidente que el lavado de los frutos solamente con agua destilada burbujeada con oxígeno (convección forzada) disminuyó el porcentaje de la carga microbiana inicial y que a su vez, esta disminución fue dependiente del tiempo, tal como se observa en la **Figura 4-1-2**. Cuanto mayor fue el tiempo de lavado en agua destilada, menor fue el FI (%) durante el almacenamiento. En particular, cuando los frutos fueron lavados durante 30 min, estos alcanzaron valores de FI (%) menores al resto de controles. Sin embargo, estos frutos comparados a los ozonizados, presentaron un incremento no significativo en el FI (%). A pesar de estos resultados, debe considerarse que el tiempo de lavado sin O₃ para alcanzar porcentajes de desinfección similares a los alcanzados en los frutos de arándano ozonizados resultaría muy extenso (30 min) y el movimiento turbulento que se genera en el sistema de lavado aplicado durante tiempos prolongados podría causar un daño mecánico excesivo.

4.1.2.2 Desarrollo de *B. cinerea*.

La inoculación de los frutos de arándano con *B. cinerea* BAFC 3003 se realizó de acuerdo a lo descrito en el **ítem 3.7.2**.

Es importante mencionar que antes de llegar a las condiciones finales de inoculación, la técnica fue puesta a punto variando algunos parámetros que permitieron dilucidar la mejor forma de realizar la inoculación del moho en cada una de las muestras. A continuación se describe la puesta a punto del método.

a. Desinfección

Uno de los aspectos a resolver fue la forma de desinfección de los frutos antes de ser inoculados para eliminar la microbiota nativa inicial. En bibliografía se reportan varias formas de desinfección, entre ellas el empleo de alcohol 75 % o una solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (Pangloli y Hung, 2013; Rivera y col., 2013).

Cuando la desinfección se realizó con alcohol al 75 %, las muestras fueron frotadas una por una con un algodón embebido en alcohol. Inmediatamente se observó que este procedimiento removía en gran parte la cera presente en la superficie del fruto, por lo que se descartó esta alternativa. Otro grupo de muestras se desinfectaron con solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio. Los frutos que fueron desinfectados de esta forma se almacenaron al menos 8 días para hacer un seguimiento visual y verificar si se había logrado desinfección del fruto. A partir del día 6, se observó un valor de 8,3 de FI (%) (**Figura 4-1-3 b**).

b. Concentración inicial de conidios y cantidad inoculada sobre el fruto.

Otra de las variables a tener en cuenta fue la concentración inicial de conidios de *B. cinerea* y la cantidad que se inocularía en los frutos. Se probaron dos concentraciones: 10^4 y 10^7 conidios/mL (concentración inicial en el inóculo), y tres volúmenes de suspensión: 5, 10 y 20 μ L (Mehra y col., 2013; Pangloli y Hung, 2013; Rivera y col., 2013). El inóculo fue sembrado en los frutos de dos formas: **a**) dos grupos sobre la zona de inserción del pedúnculo del fruto y **b**) otros dos grupos fueron sumergidos por 5 min en una solución de agua peptonada que contenía las mismas concentraciones de conidios iniciales ya mencionadas. De los dos grupos que le correspondían a cada forma de inoculación (**a** o **b**), a un grupo se le realizó una micro-herida en la zona de inserción del pedúnculo (zona común de crecimiento), mientras que al otro grupo no se le realizó dicha injuria.

La incubación de todas las muestras se realizó a una de temperatura de 21 ± 1 °C y una humedad relativa > 90%, adecuadas para favorecer el crecimiento del hongo. Las muestras se inspeccionaron visualmente al menos durante 8 días seguidos.

Los frutos que fueron inoculados con 10^4 conidios/mL en todas las condiciones ya mencionadas presentaron crecimiento en algunos frutos, observándose dificultad del hongo para desarrollar; en algunas bandejas inclusive no se detectó su presencia. Después de 3 días de almacenamiento el hongo creció en tan solo el 20 % de los frutos inoculados (en cualquiera de las formas de inoculación) y hasta el día 8 de seguimiento este porcentaje no varió; por tanto, se descartó esta concentración para inocular a los frutos. En cambio, en todos los casos (excepto para el volumen de 5 μ L), los frutos inoculados con una concentración inicial de 10^7 conidios/mL mostraron crecimiento del hongo en la zona de inserción del pedúnculo durante las primeras 48 h, tanto en los frutos inoculados con 10 y 20 μ L sobre la zona de inserción del pedúnculo o en aquellos

frutos que fueron sumergidos (con micro-herida). Después de 8 días de almacenamiento el valor FI (%) fue de 85 % en ambos casos. Los frutos sumergidos y a los que no se había realizado una micro-herida presentaron crecimiento pero en un menor porcentaje; después de 8 días de almacenamiento el FI (%) fue del 70 %.

A partir de estos resultados, se decidió no trabajar con 5 o 20 μL de suspensión, ya que en el momento de inocular los frutos representaban volúmenes muy pequeños o muy grandes (derrame del inóculo alrededor del fruto), respectivamente. La posibilidad de sumergir los frutos se descartó ya que el crecimiento del hongo en cualquier de las formas de inoculación antes mencionadas se produjo fundamentalmente en la zona de inserción del pedúnculo y no en toda la superficie del fruto (epidermis). Por lo expuesto, se decidió inocular directamente en dicha zona haciendo una micro-herida utilizando 10 μL de la suspensión del conidio (**Figura 4-1-3 c**). La concentración final adherida al fruto fue aproximadamente de 10^5 conidios/fruto.

c. Temperatura de almacenamiento para la adhesión del hongo al fruto

Finalmente para favorecer la adhesión del hongo al fruto, éstos se almacenaron en un área limpia y desinfectada a 21 ± 2 °C durante la noche (Mehra y col., 2013; Pangloli y Hung, 2013; Rivera y col., 2013).

La selección de los tratamientos de ozono para la descontaminación de los frutos inoculados superficialmente con *B. cinerea* se realizó en base al análisis de resultados obtenidos en los estudios de la micobiota nativa. Las muestras inoculadas con *B. cinerea* no fueron sometidas a todos los tratamientos propuestos en el **ítem 4.2.1**, ya que el FI (%) con micobiota nativa no evidenció grandes diferencias, ya sea entre las concentraciones de ozono ensayadas o los diferentes tiempos de exposición. Para evaluar el efecto de la concentración, las muestras fueron expuestas a 3,0 y 5,1 $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ durante 20 min. Para evaluar el efecto del tiempo de exposición, las muestras fueron ozonizadas a una concentración de 5,1 $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ durante 10 y 20 min.

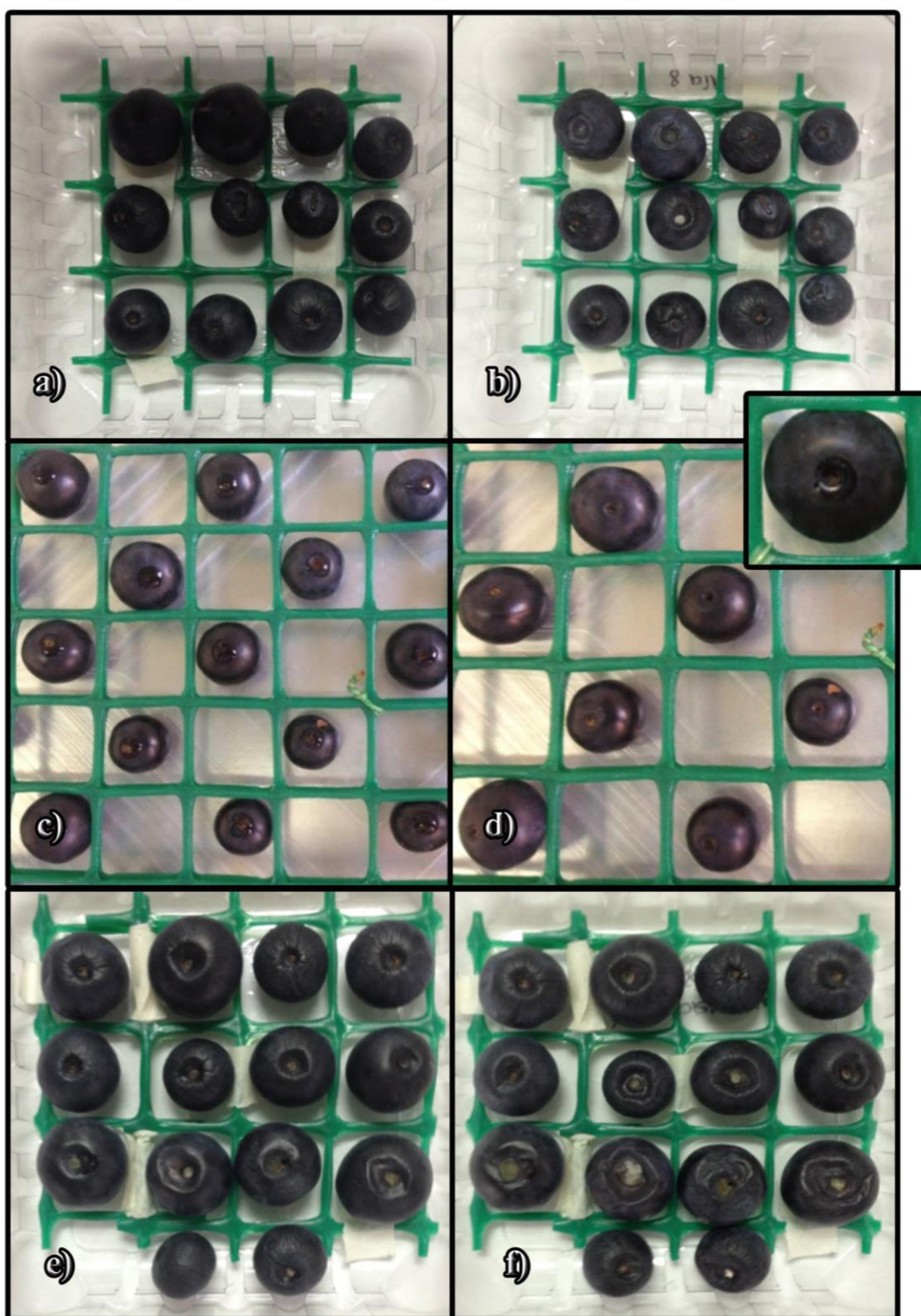


Figura 4-1-3. Frutos de arándano: desinfectados con una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio después de (a) 4 días y (b) 8 días de almacenamiento; (c) inoculados con 10 μ L de una suspensión de 10^7 conidios/mL de *B. cinerea* y (d) apariencia del inóculo después de una noche de almacenamiento a 21 ± 1 °C. (e) y (f) frutos inoculados y almacenados durante 4 y 8 días, respectivamente.

Debido al rápido crecimiento de *B. cinerea* en los frutos contaminados artificialmente y a la deshidratación de los mismos debido a la microherida realizada, éstos fueron almacenados durante solamente 15 días y durante 20 días como en el caso de flora nativa. Un control inoculado correspondiente al mismo lote fue almacenado a 21 °C (FF_(B.c)*) con el objeto de evaluar el efecto de la temperatura en el comportamiento del moho cuando éste se encuentra bajo condiciones favorables. Al mismo tiempo este control se utilizó para confirmar la efectividad de la inoculación del hongo en los frutos durante las primeras 48 h.

En la **Figura 4-1-4** se observa la evolución del FI (%) para los diferentes controles y frutos expuestos a las distintas concentraciones de ozono y tiempos ensayados. Los frutos FF_(B.c)* mostraron crecimiento de *B. cinerea* ya en el día 1, y a los 8 días de almacenamiento el 78 % de los frutos mostró infección. Los frutos control inoculados y almacenados a 4 ± 1 °C (FF_(B.c)) presentaron infección con el moho a partir del cuarto día de almacenamiento, mientras que los controles inoculados y posteriormente tratados en agua destilada burbujeada con oxígeno presentaron crecimiento a partir de los días 2 (control_(B.c) O₂ 10 min) y 4 (control_(B.c) O₂ 20 min) de almacenamiento. Por otro lado el crecimiento de *B. cinerea* en los frutos ozonizados se detectó a partir de los días 5 (3,0 mg O₃.L⁻¹ 20 min y 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min) o 6 de almacenamiento (5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min). En todos los casos en que las muestras fueron tratadas con ozono, se observó un efecto inhibitorio en el desarrollo de *B. cinerea*.

En la **Tabla 4-2** se detallan los valores de FI (%) durante los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Al igual que en el caso de la micobiota nativa, el análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores; éste no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{36, 98} = 1,22$; $p = 0,2200$), es decir, las diferencias entre tratamientos no se modificaron con el tiempo. Al contrastar todas la muestras almacenadas a una temperatura de 4 ± 1 °C, el valor de FI (%) fue significativamente menor ($F_{6, 98} = 115,65$; $p < 0, 0001$) en las muestras ozonizadas respecto a sus respectivos controles (control_(B.c) O₂ 10 min, control_(B.c) O₂ 20 min) y a las muestras FF_(B.c).

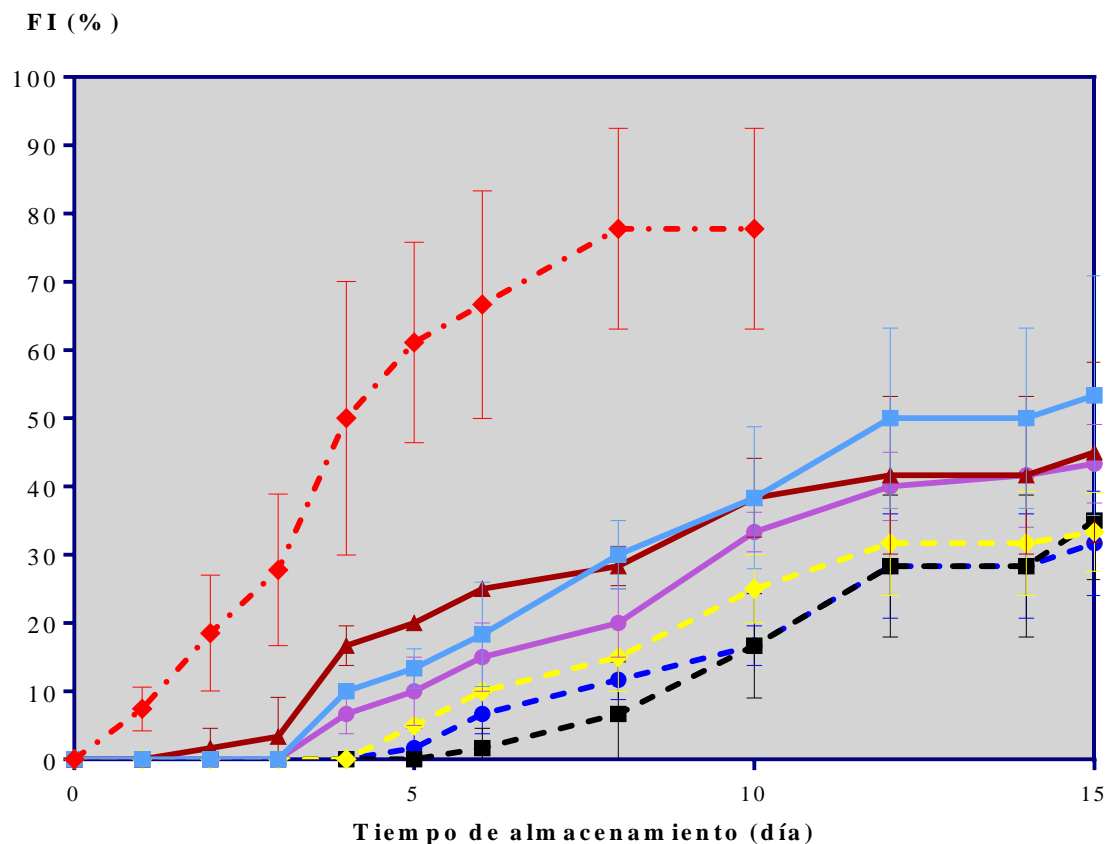


Figura 4-1-4. FI (%) con *B. cinerea* BAFC 3003 de arándanos expuestos a distintas dosis de ozono y almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días. FF_(B.c) (♦); control_(B.c) O₂ 10 min (▲); control_(B.c) O₂ 20 min (●); 3,0 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●). FF_(B.c)* (♦) almacenado a 21 ± 1 °C durante 10 días. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Las muestras solamente inoculadas, FF_(B.c) y FF_(B.c)* mostraron diferencias significativas cuando se almacenaron a diferentes temperaturas. Después de 10 días de almacenamiento se observó un FI (%) significativamente superior en las muestras control almacenadas a 21 ± 1 °C (78 %) respecto de las muestras control almacenadas a 4 ± 1 °C (38 %). El desarrollo de *B. cinerea* en las muestras que fueron almacenadas a 21 ± 1 °C se observó ya a las 24 h de la inoculación.

Todos los tiempo de almacenamiento analizados fueron significativamente diferentes entre sí ($F_{6, 98} = 67,32$ $p < 0, 0001$). El porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento.

Tabla 4-2. Valores medios del porcentaje de frutos infectados con *B.cinerea* en frutos control y tratados con distintas concentraciones de ozono (3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹) a diferentes tiempos de exposición (0, 10 y 20 min) y almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)													
	0		5		10		15		Promedio					
	FI (%) ± DE													
FF _(B,c) *	ND	61,1	±	14,7	77,8	±	14,7		11,4	±	4	a		
FF _(B,c)	ND	13,3	±	2,9	38,3	±	10,4	53,3	±	17,6	5,3	±	4	b
Control _(B,c) O ₂ 10 min	ND	20,0	±	0,0	38,3	±	5,8	45,0	±	13,2	5,4	±	3	b
Control _(B,c) O ₂ 20 min	ND	10,0	±	5,0	33,3	±	2,9	43,3	±	5,8	4,2	±	3	b
3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	ND	5,0	±	0,0	25,0	±	5,0	33,3	±	5,8	3,0	±	3	c
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	ND	0,0	±	0,0	16,7	±	7,6	35,0	±	8,7	2,2	±	3	d
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	ND	1,7	±	2,9	16,7	±	2,9	31,7	±	7,6	2,4	±	3	c,d
Promedio Total		3,0	±	4,0	6,8	±	4,0	8,9	±	3,0				
				B			C			D				

ND: visualmente sin desarrollo

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre días de almacenamiento.

Considerando los frutos inoculados con *B. cinerea* y posteriormente ozonizados, la concentración que permitió obtener en promedio los mejores resultados fue 5,1 mg O₃.L⁻¹ independientemente del tiempo de exposición. Por lo tanto, la desinfección de frutos de arándano con esta concentración de ozono y un tiempo de exposición de 10 min representaría el tratamiento más adecuado, ya que a mayores tiempos de exposición no se observó una disminución en el valor de FI (%).

Se han reportado pocos estudios sobre la eficiencia del ozono en fase acuosa en la flora nativa y microorganismos inoculados en frutos de arándano. Pangloli y Hung (2013) evaluaron la eficiencia de agua ozonizada (1,5 mg O₃.L⁻¹, 1 - 5 min) en arándanos inoculados con *Escherichia coli* O157:H7. Ellos observaron una reducción de 2,28; 3,05 y 3,49 ciclos logarítmicos de este patógeno cuando las frutas fueron expuestas a 1, 3 y 5 min de ozono, respectivamente. Bialka y Demirci (2007) evaluaron el efecto del ozono disuelto en agua en arándanos inoculados con *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*. Las frutas fueron sometidas a diferentes tiempos de tratamientos (2 - 64 min) y temperaturas (20 y 4 °C). Después de 64 min de exposición a ozono (8,9 y 21 mg O₃.L⁻¹ a 20 y 4 °C, respectivamente), se observaron reducciones significativamente altas respecto a los tiempos más cortos para ambos microorganismos. Cuando la temperatura fue más baja, se incrementó el número de reducciones logarítmicas: a 20 °C estos autores lograron reducir 4,9 y 4,7 log CFU/g las poblaciones de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* respectivamente, mientras que a 4 °C los valores de reducción alcanzados fueron de 5,2 y 6,2 log CFU/g, respectivamente. Crowe y col. (2012) evaluaron la respuesta de aerobios totales, hongos y levaduras propias de arándanos ozonizados en forma de spray (1 mg O₃.L⁻¹) y almacenados durante 12 meses a -18 ° C. Inmediatamente después del tratamiento, observaron diferencias significativas en el recuento de los microorganismos evaluados entre las muestras ozonizadas y sin tratar. Sin embargo, después de 12 meses de almacenamiento, el recuento de cada uno de estos microorganismos en las muestras tratadas fue similar al control a pesar de haber mostrado mayores reducciones logarítmicas en cada población las muestras ozonizadas.

El efecto del agua ozonizada también ha sido evaluado en muchas otras frutas: cítricos, manzanas, peras, uvas, frutillas, tomate, entre otras. Contigiani y col. (2018) observaron efectos significativos del ozono en fase acuosa (3,5 mg.L⁻¹, 5 min) sobre la micobiota nativa de las frutillas almacenadas a 5 °C durante 12 días. En general, el porcentaje de frutos infectados después de 12 días de almacenamiento fue ~ 22 - 25 % menor respecto al control. Smilanick y col. (2002)

evaluaron el efecto de agua ozonizada (10 mg.L⁻¹, 1 - 6 min) en la extensión de la vida útil de uva en racimos previamente inoculadas con *B. cinerea*. La población de conidios de *B. cinerea* (causante del moho gris) fue reducida entre un 26 y 35% respecto al control después de 1 min de exposición a 10 mg O₃.L⁻¹.

4.1.3 Estudio de la estructura

El arándano es un fruto “blando”, caracterizado por una pared tangencial externa (PTE) bien desarrollada, tal como se cita en el **ítem 2.2.2.2** de la introducción. La organización de la PTE responde al modelo desarrollado por Lyshede (1982) y Jeffree (2006), tal como se esquematiza en la **Lámina 4-1-I A**, pudiendo distinguirse en la misma cuatro capas principales desde afuera hacia adentro, a saber (Fava y col., 2006):

- 1- las ceras epicuticulares (ce), amorfas y/o cristalinas;
- 2- la cutícula, denominada también membrana cuticular (MC), integrada por la cutícula propia (c), compuesta casi exclusivamente por cutina (poliéster de ácidos grasos de C16 y C18 polihidroxilados) y la capa cutinizada (cc), constituida por un esqueleto de celulosa incrustado con cutina, ceras y pectinas;
- 3- la capa péctica (cp), compuesta principalmente por polisacáridos pécticos;
- 4- la capa celulósica o capa no cutinizada (p), consistente en redes interactuantes de celulosas y hemicelulosas, polisacáridos pécticos, extensina y otros componentes menores.

En particular, la piel (formada por las capas superficiales externas, y los tejidos epidérmicos y subepidérmicos) le confiere resistencia mecánica al fruto mientras que la cutícula controla la pérdida de agua difusional debido a su naturaleza hidrofóbica, siendo las ceras los componentes más importantes en su rol como barrera impermeable (Schreiber y Schonherr, 2009; Lara y col., 2014; Chu y col., 2018).

Este estudio estructural se enfoca principalmente en el análisis del impacto del tratamiento de ozono en la piel, dado el importante papel que ésta juega en las propiedades reológicas y en la pérdida de peso de los frutos.

4.1.3.1 Observación de la microestructura

En el **ítem 3.10.1** se menciona la preparación de las muestras control y las tratadas para su observación en el microscopio óptico. Para estos estudios se consideró solamente los tratamientos más severos. Por lo tanto, se evaluaron los frutos tratados durante 20 y 30 min con una concentración de 5,1 mg O₃.L⁻¹.

Tejido de arándano fresco

En la **Lámina 4-1-I B-D** se observan cortes transversales del tejido de los frutos frescos (FF) de arándano, que muestran el aspecto general (**Lámina 4-1-I B**) y detalles del epicarpo (**Lámina 4-1-I C**) y del mesocarpo (**Lámina 4-1-I D**). El epicarpo (E) estaba formado por un estrato de células epidérmicas y la hipodermis constituida por 2 ó 3 capas de células subepidérmicas. Las células epidérmicas (EP) aparecían organizadas en una monocapa continua de células cuadrangulares a rectangulares fuertemente unidas mientras que las células hipodérmicas, de forma rectangular a isodiamétrica, aparecían menos fuertemente contactadas. Se podían observar antocianinas (flavonoides responsables del color azul) acumuladas en las células epidérmicas y subepidérmicas, distribuidas en las vacuolas como agregados de forma indefinida o con forma esférica, o bien posicionadas contra el tonoplasto. La pared tangencial externa se coloreó intensamente con azul de toluidina: la cutina (cutícula) tomó un color azul intenso y los polisacáridos de las paredes celulares y la capa cutinizada color púrpura. Se visualizó ondulada con una cutícula propia muy oscura, una capa cutinizada reticulada más clara y una capa celulósica bien teñida (**Lámina 4-1-I B, C**). La pared tangencial externa (PTE) se observó más gruesa que las paredes radiales (PR) y la pared tangencial interna (PTI). (**Lámina 4-1-I C**). El mesocarpo estaba compuesto por células distendidas de contorno redondeado a irregular, con el citoplasma en posición parietal (**Lámina 4-1-I B-D**). Se observaron en el mismo haces vasculares, grupos (2 á 8) de fibroesclereidas y esclereidas aisladas conspicuas.

Tejido de arándano tratado con ozono

Inmediatamente después del tratamiento, los frutos tratados con $5,1 \text{ mg O}_3\text{L}^{-1}$ durante 20 minutos mostraron en general una compactación tangencial severa de las células epidérmicas y subepidérmicas (principalmente de la primera capa) (**Lámina 4-1-II A**). En las células compactadas las vacuolas se mostraban repletas de contenidos. Algunas células subepidérmicas de las capas cercanas al mesocarpo se observaron irregulares, foldeadas, angulosas, con espacios intercelulares conspicuos (**Lámina 4-1-II B**).

En los frutos expuestos durante 30 minutos, la epidermis en vista transversal presentó compactación tangencial de células epidérmicas (**Lámina 4-1-II D**). En algunas zonas el grado de compactación de las mismas fue menor (**Lámina 4-1-II C**). La compactación no afectó al epicarpo completo y las células subepidérmicas aparecían turgentes con citoplasma parietal y vacuola central, numerosas vesículas con contenido y paredes celulares nítidas (**Lámina 4-1-II C, D**). La tinción de la capa cutinizada fue menor a la del control y también se observó una coloración menos intensa a nivel de las paredes radiales. Se pudo observar claramente una mayor separación entre las células epidérmicas y subepidérmicas. Estas últimas, en algunas zonas, presentaban menores puntos de contacto entre células adyacentes, pero mantuvieron su organización.

Al igual que en los frutos ozonizados durante 20 min, pudieron detectarse en los frutos expuestos 30 min algunas micro rupturas en la PTE (**Lámina 4-1-II B, D**)

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos en este ítem y con el objeto de establecer si el movimiento provocado por el burbujeo del gas tuvo algún efecto en el tejido de los frutos, se realizaron fotomicrografías de FF y algunos controles, utilizando frutos correspondientes a un lote de otro año. En la **Lámina 4-1-III** se muestran las micrografías del corte transversal del tejido de los frutos frescos (FF, **A, B**) y algunos controles (control O_2 10 min, **C, D**; control O_2 20 min, **E, F**).

Se pudo observar que los frutos que fueron sumergidos en agua destilada burbujeada con O_2 durante 20 minutos presentaron una importante compactación tangencial de la PTE y de las células epidérmicas y un incremento en los espacios intercelulares y en la separación entre células epidérmicas y subepidérmicas (ya empezado a visualizarse en los frutos tratados sólo durante 10 min) (**Lámina 4-1-III E-F**).

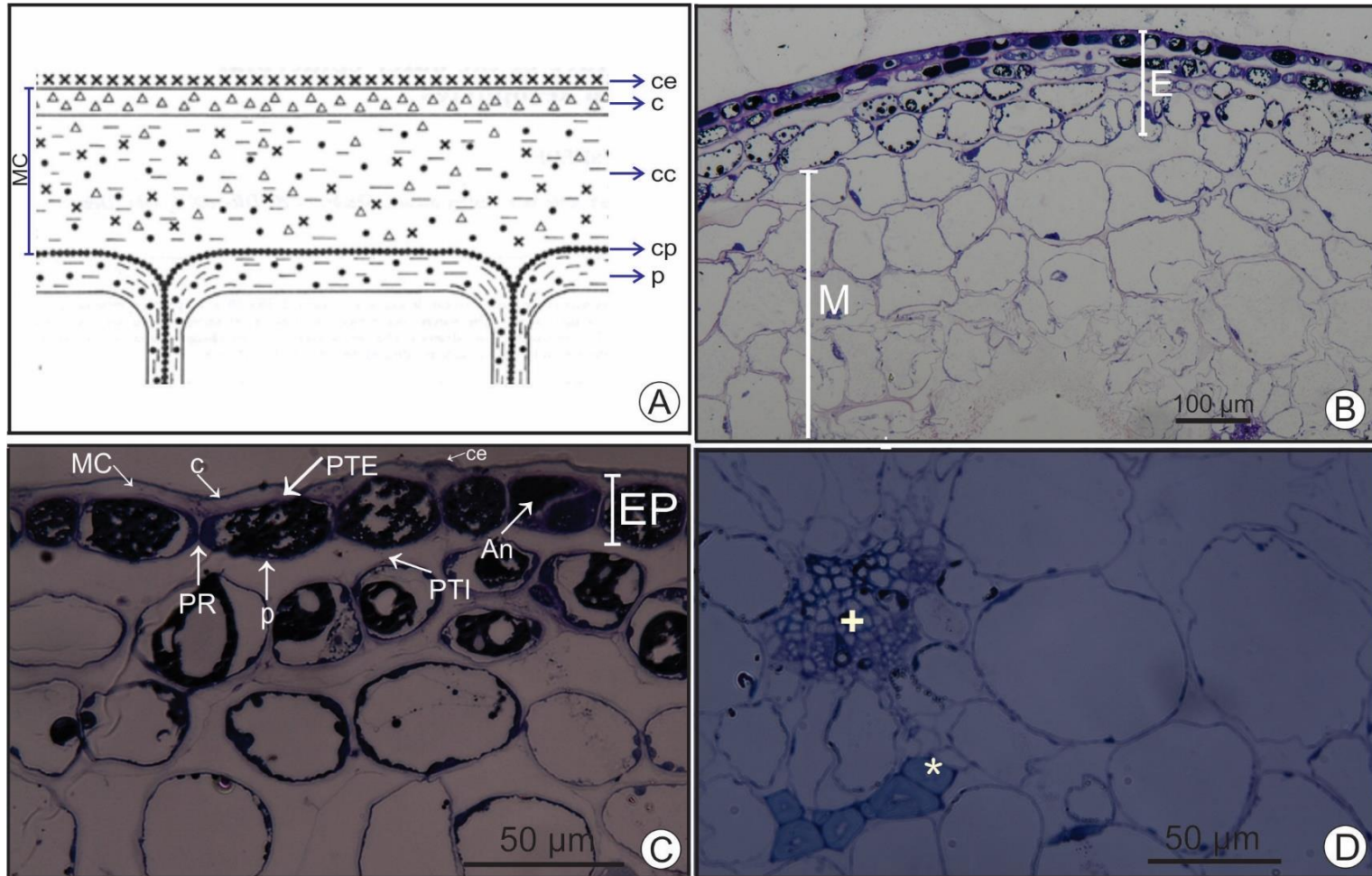


Lámina 4-1-I. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco (FF). **A:** esquema de la PTE de una célula epidérmica, adaptado de Lyshede (1982) (membrana cuticular, MC; ceras epicuticulares, ce; cutícula propia, c; capa cutinizada, cc; capa péctica, cp; capa celulósica, p); x = ceras; Δ = cutina; • = pectinas; - = celulosa. **B-D:** aspecto general de un corte transversal del tejido de arándano (epicarpo, E; mesocarpo, M; epidermis, EP; pared tangencial externa, PTE; pared tangencial interna, PTI; pared radial, PR; pared celular, p; antocianinas, An). **D:** detalle del mesocarpo (haces vasculares, +; fibroesclereidas, *).

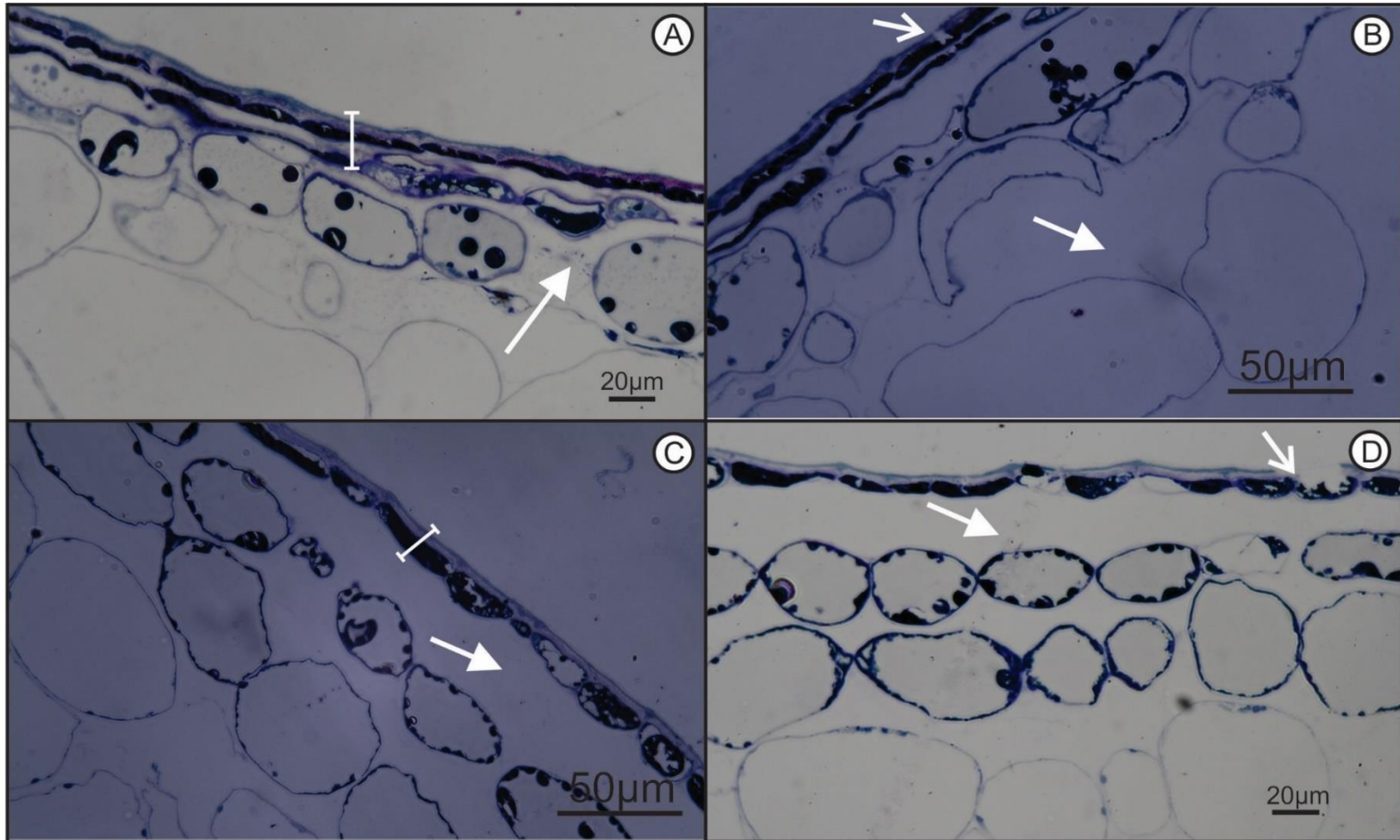


Lámina 4-1-II. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano (corte transversal) tratados con una concentración de 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 20 (A, B) y 30 min (C, D): (→) disrupciones, (→) espacios intercelulares, (|) compactación tangencial

También se produjeron disrupciones en algunas zonas de la epidermis (**Lámina 4-1-III D**) y separación de la membrana cuticular (**Lámina 4-1-III E-F**) y a su vez este comportamiento se atenuó cuanto mayor fue el tiempo de burbujeo. Estos resultados podrían estar indicando que algunas de las diferencias estructurales observadas entre los FF y ozonizados no se deberían solamente al efecto *per se* del ozono como tal, sino también, al efecto mecánico producido por el burbujeo del gas, más pronunciado cuanto mayor fue el tiempo de exposición. Sin embargo, ambos controles de O₂ mostraron una PTE densamente teñida, a diferencia de lo detectado en las frutas ozonizadas, la cual demostraría el efecto específico del ozono en los componentes de la PTE.

Tejido de arándano fresco y tratado con ozono y almacenado en refrigeración

Luego de **10 días** de almacenamiento en refrigeración, el tejido de los FF almacenados mostró leves diferencias respecto de los FF al día 0. Las células epidérmicas, cuadrangulares a rectangulares, mostraron numerosas vacuolas con citoplasma denso entre éstas. En la pared tangencial externa, en algunas secciones se observó la capa cuticular rota (no se muestran las micrografías). La cutícula se tiñó de azul intenso con cuñas a nivel de las paredes radiales de las células epidérmicas; la capa cutinizada tomó coloración púrpura y se observó claramente la capa péptica y la capa celulósica. La pared tangencial interna se observó, en algunas zonas, levemente engrosada respecto del control, con una coloración púrpura pero en otras secciones incoloras. En el mesocarpo las células fueron irregulares y grandes (**Lámina 4-1-IV A**).

El almacenamiento refrigerado indujo cambios importantes en los frutos ozonizados. Los frutos tratados con ozono durante 20 min y almacenados durante 10 días presentaron un epicarpo laxo, con una compactación relativa de la epidermis. Se visualizó una leve contracción tangencial y en algunas zonas disrupción de la PTE externa. También en dicha pared se observó algunos sectores con membrana cuticular ancha y otros con membrana cuticular angosta y compacta. La coloración de la cutícula propia y la capa cutinizada fue similar a la del control. Algunas células epidérmicas aparecían enteras, con inclusiones muy teñidas de diferente tamaño y forma; en otras zonas la PTE mostraba microcracks y muchas células epidérmicas mostraban paredes y plasmalema rotos. Las células subepidérmicas fueron colenquimatosas y con citoplasma discontinuo (**Lámina 4-1-IV C**).

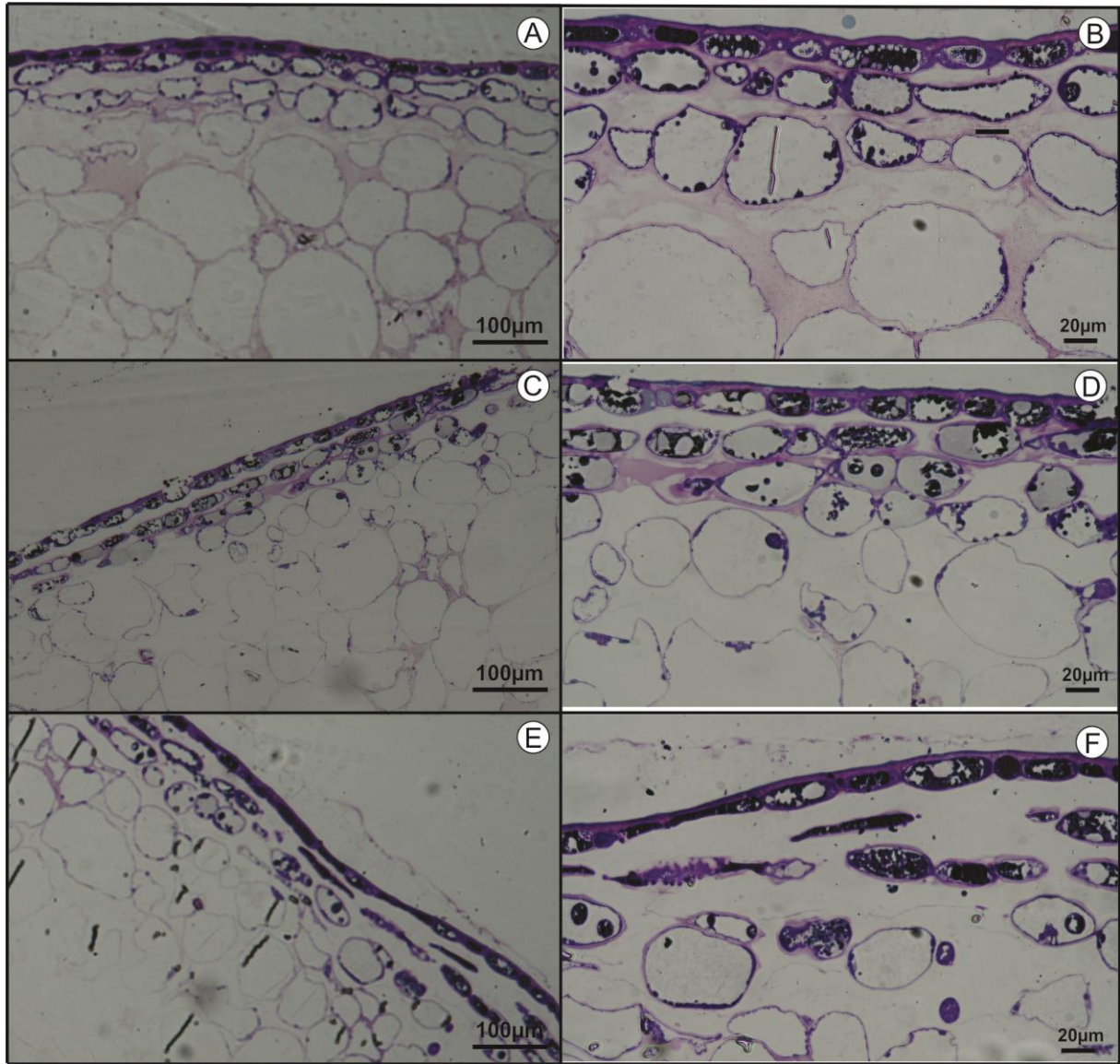


Lámina 4-1-III. Fotomicrografías con MO de frutos frescos de arándano y de frutos tratados en agua destilada burbujeada con oxígeno (lavado). **A, C, E:** aspecto general del corte transversal del tejido de los frutos FF, Control O₂ 10 min y Control O₂ 20 min, respectivamente. **B, D, F:** detalle del corte transversal de FF, Control O₂ 10 min y Control O₂ 20 min.

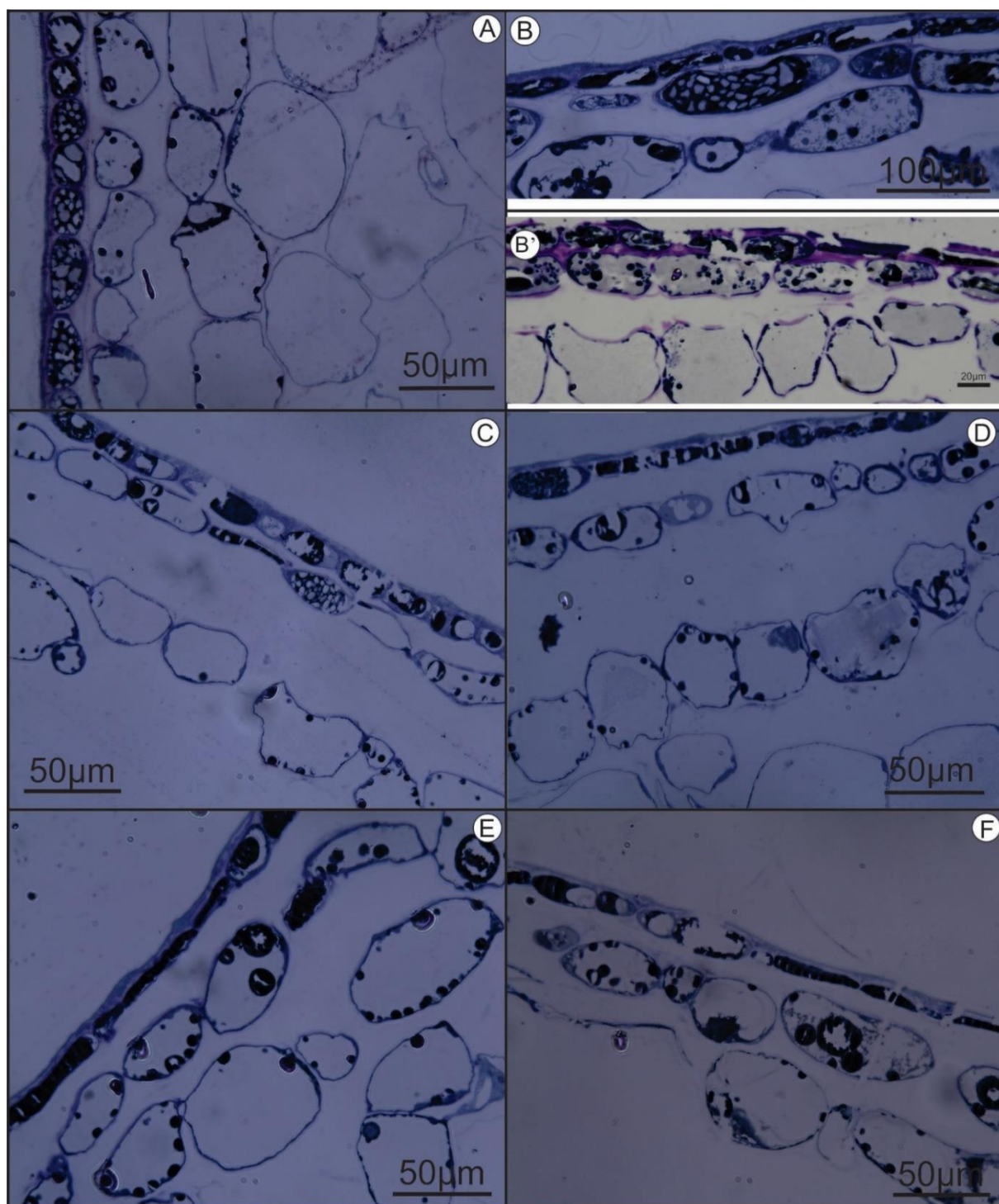


Lámina 4-1-IV. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco (A, B, B') y tratados con 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 20 min (C, D) y 30 min (E, F). Almacenados a 4 ± 1 °C por 10 (A, C, E) y 15 (B, B', D, F) días.

El mesocarpo, al igual que el epicarpo, fue laxo, con células grandes e irregulares; además con espacios intercelulares abundantes y conspicuos (las micrografías no se muestran).

El tejido de las muestras expuestas a ozono durante 30 minutos y almacenado 10 días no presentó mayores diferencias respecto al tejido de los frutos ozonados durante 20 min, a excepción de las células epidérmicas que se mostraban muy colapsadas y con un mayor grado de separación con la primera capa de las células subepidérmicas (**Lámina 4-1-IV E**).

Después de **15 días** de almacenamiento el tejido de los FF se observó marcadamente degradado. Se evidenció compactación tanto del epicarpo como de las células del mesocarpo. Se detectaron varios episodios de ruptura en la PTE, y estas microrupturas se extendían desde la cutícula propia hasta las paredes celulares de las células epidérmicas. Algunas células epidérmicas se mostraron contraídas tangencialmente; otras aparecían con paredes y membranas rotas. Las capas subepidérmicas colenquimatosas se visualizaron oblongas, con vacuolas repletas de contenido y citoplasma discontinuo (**Lámina 4-1-IV B, B'**).

Las muestras expuestas durante 20 o 30 minutos a ozono presentaron algunas similitudes con el tejido de los FF almacenados durante 15 días. Se evidenciaron signos de laxitud tanto en el epicarpo como en el mesocarpo. La epidermis en ciertos sectores se observó destruida, y la PTE rota. En general, se observaron células epidérmicas tangencialmente compactadas, algunas células subepidérmicas rotas y muy separadas. La tinción de la cutícula propia, la capa cutinizada y paredes celulares fue tenue y en algunas indicando que el tratamiento y almacenamiento prolongado de las muestras afectó visiblemente el epicarpo (**Lámina 4-1-IV D, F**). Debe en este punto recordarse que altos contenidos de celulosa y polisacáridos tratados con azul de toluidina inducen colores fuertes violetas mientras que contenidos bajos de estos compuestos resultan en tonos más claros. La diferencia estructural con los tejidos de los FF fue fundamentalmente la menor tinción de la PTE y la mayor separación entre las células epidérmicas y las subepidérmicas.

En general, puede mencionarse que el tratamiento con ozono afectó a los frutos de arándano, causando algunos cambios microestructurales en algunas zonas del epicarpo, especialmente en la PTE y las células del epicarpo (compactación tangencial de las células epidérmicas e hipodérmicas, disrupciones en algunas zonas de la PTE y paredes celulares de las células epidérmicas, incremento en los espacios entre células epidérmicas y subepidérmicas y cambios en la coloración de la PTE). Así mismo se resalta que, durante el almacenamiento, el epicarpo y el mesocarpo de las muestras tratadas y sin tratar mostraron signos de laxitud, probablemente como resultado de los procesos

fisiológicos propios de la maduración de los frutos. La respuesta estructural de los tejidos a la ozonización y al almacenamiento fue muy heterogénea, encontrándose zonas más afectadas y otras con menos cambios.

Varios estudios han mencionado que altas concentraciones de ozono pueden provocar daños en la membrana cuticular y en los tejidos epidérmicos, así como oxidación de las ceras epicuticulares, debido al elevado poder oxidante (Palou y col., 2002; Tzortzakis y col., 2007; Lara y col., 2014). Las modificaciones microestructurales observadas en este trabajo sobre los componentes de la PTE de los frutos tratados podrían estar indicando un efecto del ozono o de las especies de radicales libres ($\bullet\text{OH}$, $\text{HO}_2\bullet$, $\bullet\text{O}_2$ y $\bullet\text{O}_3$) formadas durante la auto descomposición del mismo, estos resultados podrían estar respaldados con lo reportado por Muthukumarappan y col. (2016) y Wang y col. (1999), los cuales informaron que el ozono provoca la despolimerización de macromoléculas (como pectinas y celulosa) y la degradación de los carbohidratos debido a su alto poder oxidante.

4.1.3.2 Observación de la ultraestructura

Como se mencionó en el **ítem 3.10.2**, la superficie de los frutos frescos y tratados fueron observados en un microscopio electrónico de barrido ambiental, Philips XL 30 (Holanda). Las muestras de arándano fueron colocadas enteras en el portamuestras del equipo en la modalidad bajo vacío para su observación. Para tener un panorama general del comportamiento de las ceras con respecto al ozono se evaluó los tiempos medios y extremos de exposición de los frutos de arándano a las dos concentraciones de ozono, es decir 10 y 20 min, y 15 y 30 min para las concentraciones de 3,0 y 5,1 $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Como control se evaluó solamente el correspondiente al mayor tiempo de inmersión en agua burbujeada con O_2 (Control O_2 30 min).

Superficie de arándanos frescos y control

En vista superficial, los frutos frescos (FF) en el día 0 presentaron una superficie heterogénea, reticulada con surcos o grietas, debido a la presencia de ceras epicuticulares sobre la superficie del epicarpo. Debajo de las mismas podía también observarse el contorno poligonal de las células epidérmicas (**Lámina 4-1-V A**). Las ceras epicuticulares estaban distribuidas en forma de una capa

espesa más o menos uniforme, como cristales discontinuos en forma de placas o varillas que cubrían la mayor parte de la superficie (**Lámina 4-1-V B**).

Las fotomicrografías de los frutos control sumergidos en agua burbujeada con oxígeno durante 30 min fueron similares a las de los frutos frescos, aunque el patrón de los surcos fue más irregular, las placas tendieron a unirse y fue más difícil visualizar las ceras en forma de varillas (**Lámina 4-1-V C, D**).

Superficie de arándanos tratados con ozono

En general, la superficie de los frutos ozonizados en el día 0 fue ligeramente diferente a la de los FF, siendo afectada además por la concentración de ozono y/o el tiempo de exposición. En vista superficial en todos los tratamientos pudo distinguirse el contorno poligonal de las células epidérmicas (**Lámina 4-1-VI A, C, E, G**). El patrón de distribución de las ceras epicuticulares en los frutos ozonizados fue alterado según la severidad del tratamiento.

La superficie de frutos tratados 10 min con $3,0 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ fue bastante similar al control pero el incremento de la exposición a 20 min indujo un reordenamiento heterogéneo de las ceras: en algunas zonas se mantuvieron las estrías y las formas de las placas originales pero en otras éstas parecieran haberse fragmentado, detectándose menos surcos y placas que tendían a agregarse (**Lámina 4-1-VI B, D**). Cuando los frutos se trataron con la mayor concentración de ozono, la alteración fue más importante.

En los frutos tratados con $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ durante 15 min, se observó un patrón de surcos uniforme en muchas zonas, aunque los surcos aparecían menos profundos; las placas se visualizaron fragmentadas, con menor tamaño que en los FF. Pero en otras zonas las ceras empezaban a aglutinarse desapareciendo las estrías. Después de 30 min de tratamiento, este comportamiento se profundizó: las ceras se veían principalmente aglutinadas, y las estrías, poco numerosas, eran irregulares, sin ninguna tendencia de distribución (**Lámina 4-1-VI H**).

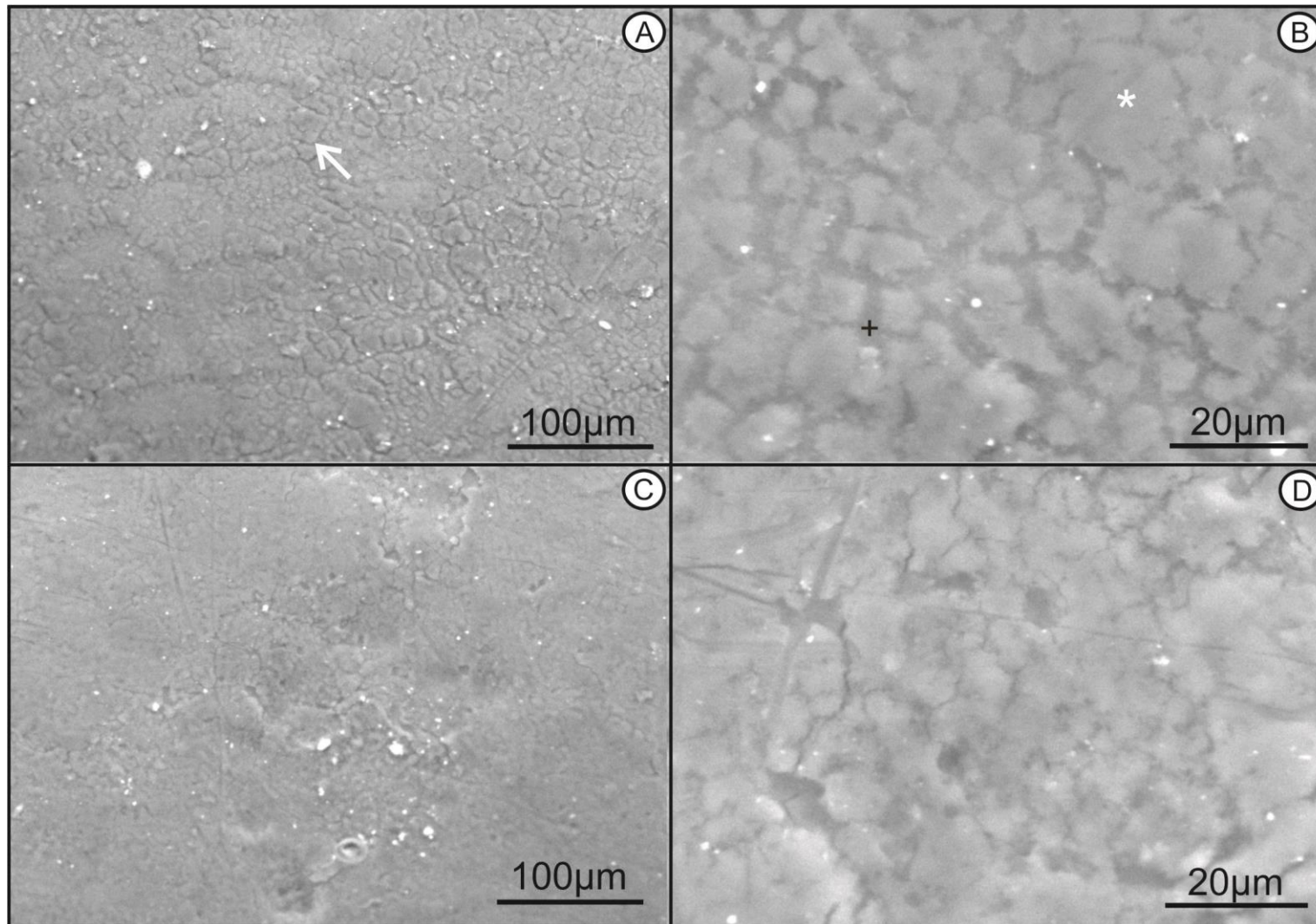


Lámina 4-1-V. Fotomicrografías con MEBA de frutos de arándano fresco (**A, B**) y control (Control O₂ 30 min, **C, D**). **A, C**: aspecto general de la superficie de arándano; **B, D**: detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. (*****) ceras en forma de placas, (+) surcos entre ceras epicuticulares, (→) contorno poligonal de las células epidérmicas.

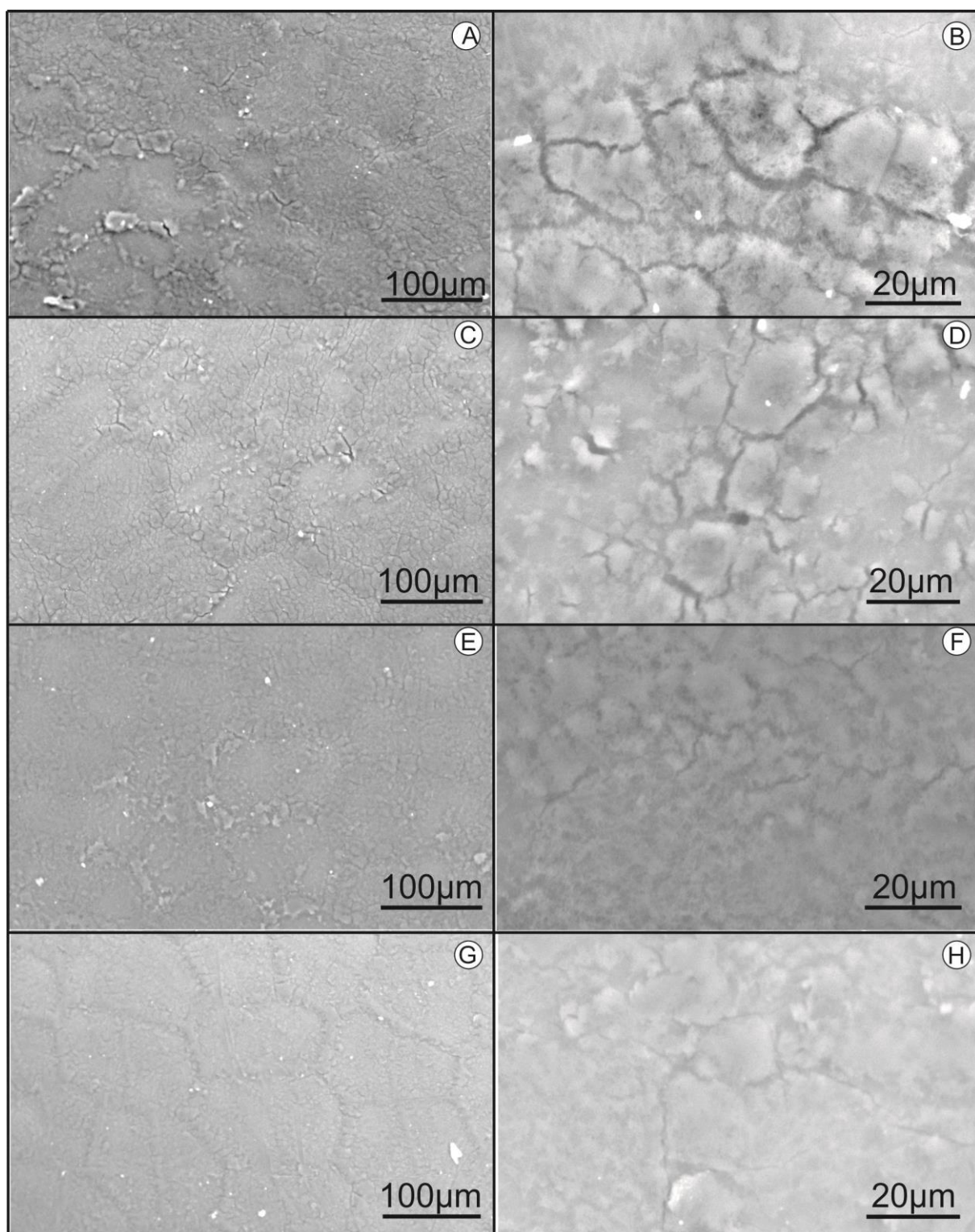


Lámina 4-1-VI. Fotomicrografías con MEBA de frutos tratados con ozono. 3,0 mg $O_3.L^{-1}$: 10 min (A, B), 20 min (C, D); 5,1 mg $O_3.L^{-1}$: 15 min (E, F), 30 min (G, H). A, C, E, G: aspecto general de la superficie de arándano; B, D, F, H: detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial.

Superficie de arándanos fresco, control, ozonizados y almacenados en refrigeración

Después de **10 días** de almacenamiento en refrigeración, los FF y los ozonizados a la menor concentración de ozono presentaron ligeras alteraciones respecto del día 0 (**Lámina 4-1-VII A, C, D**). Pero en los frutos control O₂ 30 min las ceras aparecían sobre la superficie en agregados menos densos, resultando en una distribución más laxa indicativa de una capa de ceras de menor espesor (**Lámina 4-1-VII B**). Los frutos expuestos a la mayor concentración de ozono exhibieron características similares a la de los frutos control O₂ 30 min, aunque con una distribución menos homogénea de las ceras, lo que permitía vislumbrar la superficie del epicarpo con mayor nitidez (**Lámina 4-1-VII E, F**).

Las imágenes a los **15 días** de almacenamiento confirmaron la leve modificación de las ceras en los FF (**Lámina 4-1-VIII A, B**) por efecto del almacenamiento refrigerado. En cambio, esta etapa modificó en forma importante el estado de las ceras en los frutos ozonizados. Ocurrió una redistribución de ceras y una reducción en el espesor de la capa de ceras en los arándanos tratados, lo cual permitió observar el contorno notorio de las células epidérmicas (**Lámina 4-1-VIII C-F**).

Este estudio de la ultraestructura de la superficie con MEBA permitió establecer que los tratamientos estudiados modifican la capa de ceras epicuticulares de los frutos de arándano. Sin embargo, en estudios futuros sería conveniente abordar el impacto del ozono en la composición de dichas ceras (oxidaciones por ejemplo) a fin de incrementar el conocimiento sobre el mismo. Es bien conocido el rol que juegan las ceras epicuticulares y la cutina en el control de la pérdida de agua (debido a su naturaleza hidrofóbica) y del deterioro microbiano.

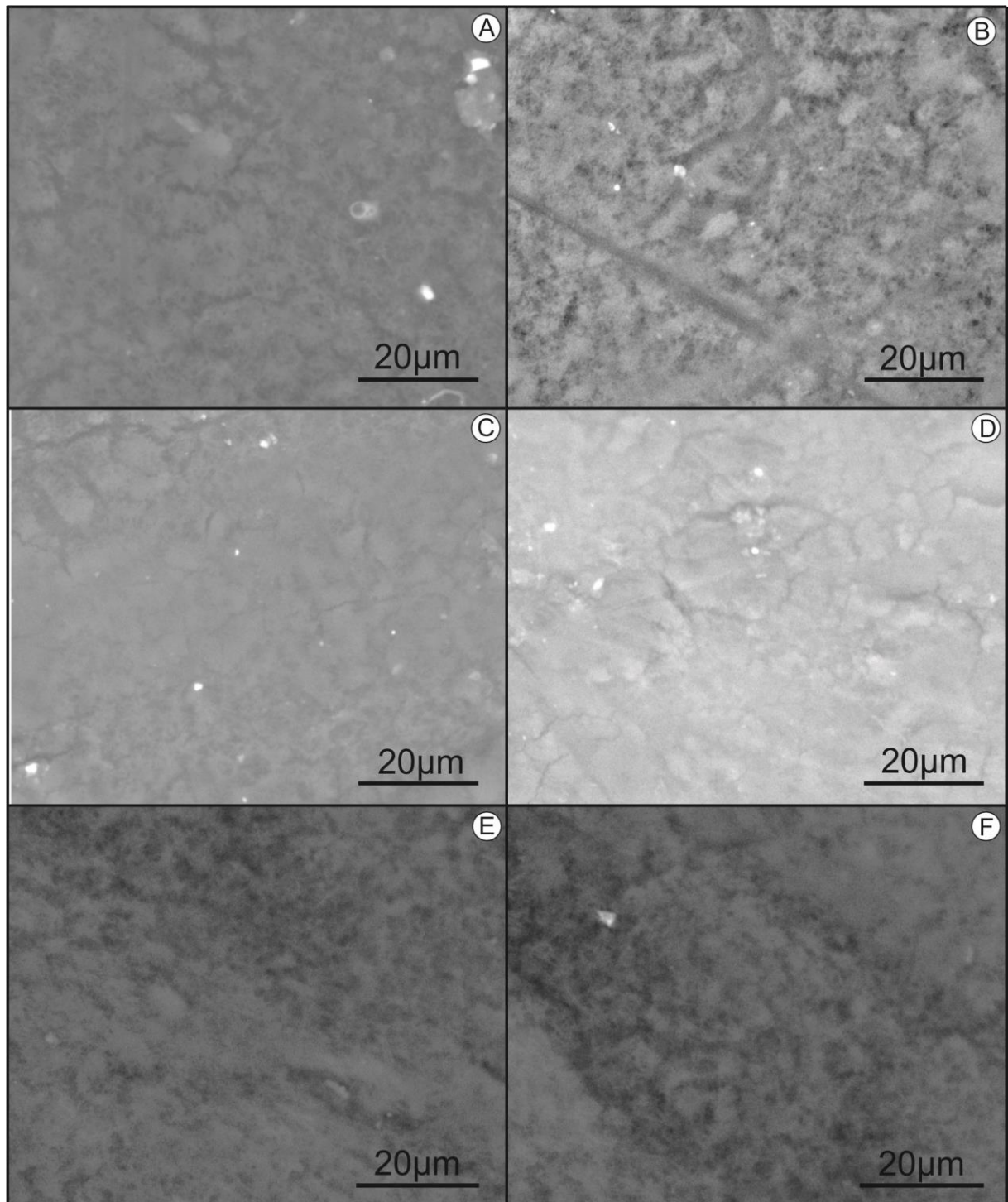


Lámina 4-1-VII. Fotomicrografías con MEBA de frutos frescos (A), control O₂ 30 min (B) y ozonizados: 3,0 mg O₃.L⁻¹: 10 min (C), 20 min (D); 5,1 mg O₃.L⁻¹: 15 min (E), 30 min (F). Detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. Almacenado durante 10 días.

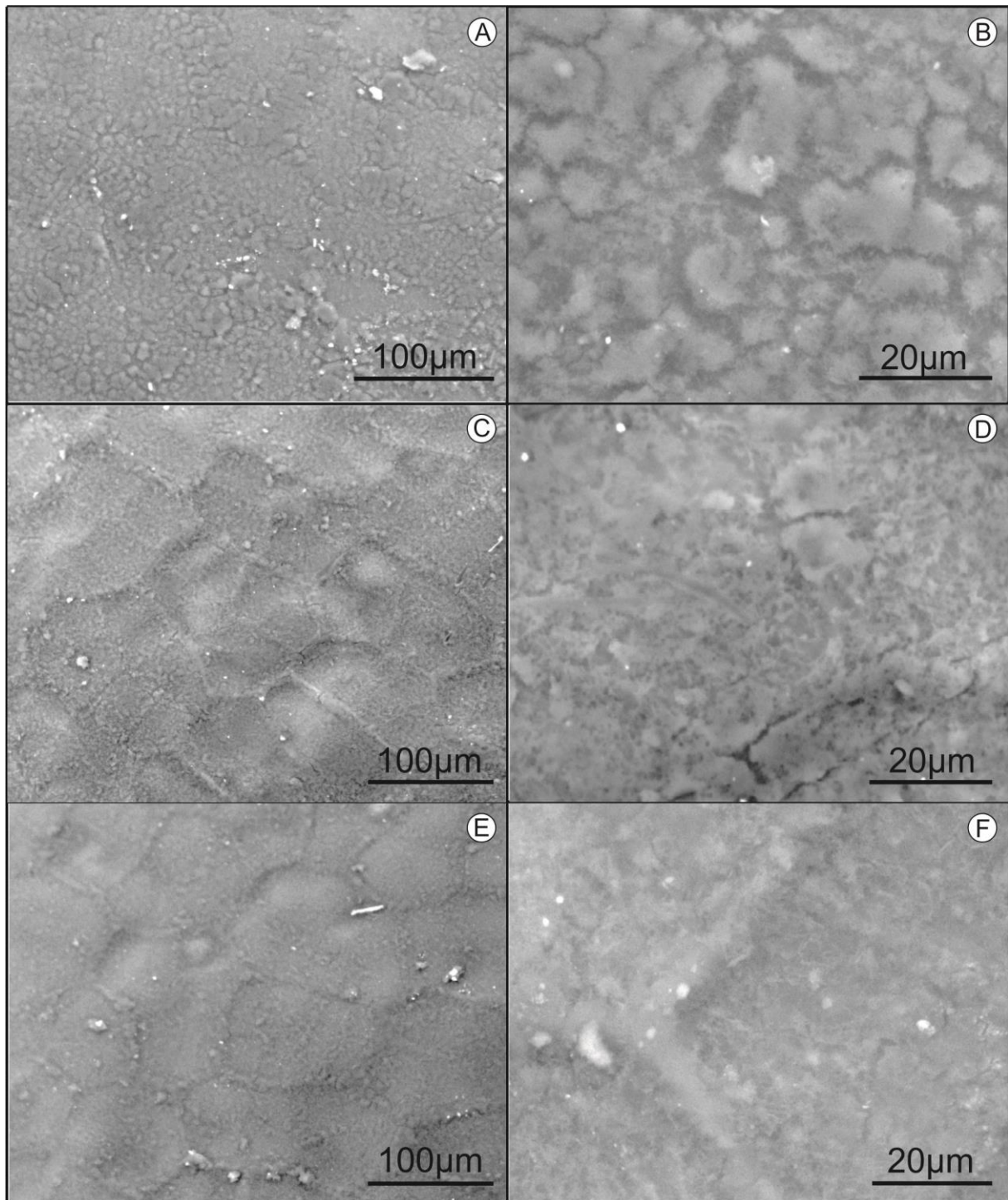


Lámina 4-1-VIII. Fotomicrografías con MEBA de frutos frescos (**A, B**) y tratados con ozono: 3,0 mg O₃.L⁻¹ 10 min (**C, D**); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 15 min (**E, F**). **A, C, E:** aspecto general. **B, D, F:** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. Almacenado durante 15 días.

4.1.4 Evaluación de los parámetros de calidad

Debido a que no se detectaron grandes diferencias en el desarrollo fúngico de los frutos expuestos a las diferentes concentraciones de ozono y tiempos de exposición, las propiedades mecánicas, la pérdida de peso y el color fueron evaluados para algunos tratamientos selectos: frutos frescos (FF), frutos expuestos a 3,0 mg O₃.L⁻¹ durante 10 min y frutos expuestos a 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 15, 20 y 30 min. La caracterización físico-química de las muestras se realizó en FF, en frutos tratados con 3,0 mg O₃.L⁻¹ durante 10 min y en frutos expuestos a 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 10 y 20 min; el número de tratamientos en este último caso fue aún más acotado tomando en cuenta los resultados previos relacionados de las propiedades mecánicas, la pérdida de peso y el color.

4.1.4.1 pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad

Las determinaciones de pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad fueron realizadas de acuerdo a lo establecido en el **ítem 3.8.1**. En la **Tabla 4-3** se detallan los resultados obtenidos para muestras tratadas con concentraciones de 3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹ a distintos tiempos de exposición, así como para los FF. Para cada uno de los parámetros analizados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y control.

Para ambas concentraciones de ozono, se observaron ligeras variaciones en el valor de **pH** de las muestras tratadas con respecto a los FF. El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{6, 24} = 0,68$; $p = 0,6700$).

A pesar de que se observó un ligero incremento significativo ($F_{3, 24} = 5,09$; $p < 0,0072$) en los frutos tratados con 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min respecto a los FF y los frutos tratados con 3,0 mg O₃.L⁻¹ y 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 10 min, los cambios observados fueron leves o prácticamente despreciables. Durante el almacenamiento, se observó un incremento leve pero significativo en los valores de pH a los 10 días de almacenamiento ($F_{2, 24} = 7,46$; $p < 0,0030$) manteniéndose prácticamente invariables hasta el final del período de evaluación.

Tabla 4-3. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de pH, acidez titulable (Acidez, % p/p de ácido cítrico), sólidos solubles (SS) y humedad (M) de los frutos de arándano fresco y tratados con distintas concentraciones de ozono (3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹) a diferentes tiempos de exposición (10 y 20 min) y almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	pH	Acidez (%)	SS (°Brix)	M (g H ₂ O/g m.s)
0	FF	3,6 ± 0,04 a, A	0,35 ± 0,06 a, A	13,0 ± 0,1 a, A	5,2 ± 0,04 a, A
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,7 ± 0,02 a,b,A	0,32 ± 0,03 a,b,A	12,9 ± 0,4 a, A	5,2 ± 0,1 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,7 ± 0,08 a,b,A	0,35 ± 0,01 a,b,A	13,4 ± 0,4 a, A	5,1 ± 0,1 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	3,8 ± 0,04 b,A	0,30 ± 0,04 b,A	13,7 ± 0,5 a, A	4,9 ± 0,1 a, A
10	FF	3,7 ± 0,06 a, B	0,32 ± 0,01 a, A	13,2 ± 0,4 a, A	5,2 ± 0,1 a, A
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,8 ± 0,04 a,b,B	0,35 ± 0,02 a,b,A	13,4 ± 0,6 a, A	5,2 ± 0,1 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,7 ± 0,04 a,b,B	0,35 ± 0,02 a,b,A	13,4 ± 0,3 a, A	5,1 ± 0,1 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	3,8 ± 0,14 b,B	0,30 ± 0,02 b,A	13,5 ± 0,5 a, A	5,0 ± 0,3 a, A
15	FF	3,7 ± 0,10 a, B	0,30 ± 0,02 a, B	14,2 ± 0,5 a, B	4,9 ± 0,3 a, A
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,8 ± 0,08 a,b,B	0,29 ± 0,05 a,b, B	13,6 ± 0,3 a, B	5,0 ± 0,3 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	3,8 ± 0,07 a,b,B	0,28 ± 0,03 a,b, B	13,6 ± 0,3 a, B	5,2 ± 0,1 a, A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	3,9 ± 0,06 b,B	0,27 ± 0,05 b, B	13,9 ± 0,2 a, B	5,0 ± 0,2 a, A

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Los valores promedios de misma columna identificados con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre días de almacenamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos para **acidez titulable** (ácido cítrico, % p/p), no se encontró interacción significativa entre los factores antes mencionados ($F_{6, 24} = 0,97$; $p = 0,4667$). Los valores de acidez titulable en las muestras ozonizadas no presentaron en general diferencias significativas con respecto a los FF, excepto en aquellos frutos que fueron tratados con una concentración de $5,1 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ de ozono durante 20 min ($F_{3, 24} = 3,97$; $p = 0,0210$); sin embargo dichos cambios fueron muy leves. Durante el almacenamiento, en los primeros 10 días no se observaron diferencias significativas respecto del día 0; sin embargo a los 15 días de almacenamiento se notó una disminución significativa ($F_{2, 24} = 7,5$; $p = 0,0033$) en los valores de acidez titulable, tanto en las muestras control como en las muestras tratadas con ozono a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Con respecto al contenido de **sólidos solubles** (SS, ° Brix), el análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{6, 24} = 1,51$; $p = 0,2178$). El contenido de SS de las muestras ozonizadas no presentó diferencias significativas ($F_{3, 24} = 1,57$; $p = 0,2227$) respecto a los frutos FF. A los 10 días el contenido de SS de todas las muestras permaneció constante. En el día 15 de almacenamiento se observó un incremento leve pero significativo en dicho valor ($F_{2, 24} = 7,09$; $p < 0,0038$).

Con respecto al contenido de **humedad** ($\text{g H}_2\text{O/g m.s}$), no se observaron diferencias significativas entre los FF y los tratamientos ($F_{3, 24} = 1,79$; $p = 0,1756$), así como tampoco se observaron diferencias significativas durante el almacenamiento ($F_{2, 24} = 1,3$; $p = 0,2898$). El análisis estadístico no señaló interacción entre “tratamientos” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{6, 24} = 1,35$; $p = 0,2730$).

En general, los cambios significativos observados en el pH, la acidez y SS durante el día 15 de almacenamiento en las muestras FF y las tratadas con ozono podrían asociarse a los procesos de senescencia propios de la fruta y no a un efecto específico del ozono, ya que los cambios se dieron tanto en muestras ozonizadas así como en las muestras control.

4.1.4.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los frutos de arándano fueron determinadas de acuerdo a la metodología establecida en el **ítem 3.8.2**.

El comportamiento mecánico típico de los frutos de arándano durante el ensayo de penetración se muestra en la **Figura 4-1-5**. Cada curva se registró desde el instante en que la punta de acero tocó el epicarpo del fruto hasta que atravesó todo el mesocarpo del mismo. Las curvas fuerza vs. desplazamiento (F vs D) del ensayo de penetración presentaron un pico de fractura bien definido, seguido de una caída abrupta de la fuerza inmediatamente después de la ruptura del epicarpo. Mientras la punta atravesó el mesocarpo del fruto la fuerza permaneció sin grandes variaciones. El epicarpo ejerció el mayor efecto en las propiedades mecánicas del arándano, contribuyendo aproximadamente en un 70 - 80 % a la firmeza de los frutos antes del punto de ruptura. Inicialmente la curva presentó una relación lineal entre la fuerza y el desplazamiento, que luego se transformó en una curva ligeramente convexa alrededor de los 2 mm de desplazamiento, indicando una disminución en la resistencia a la deformación.

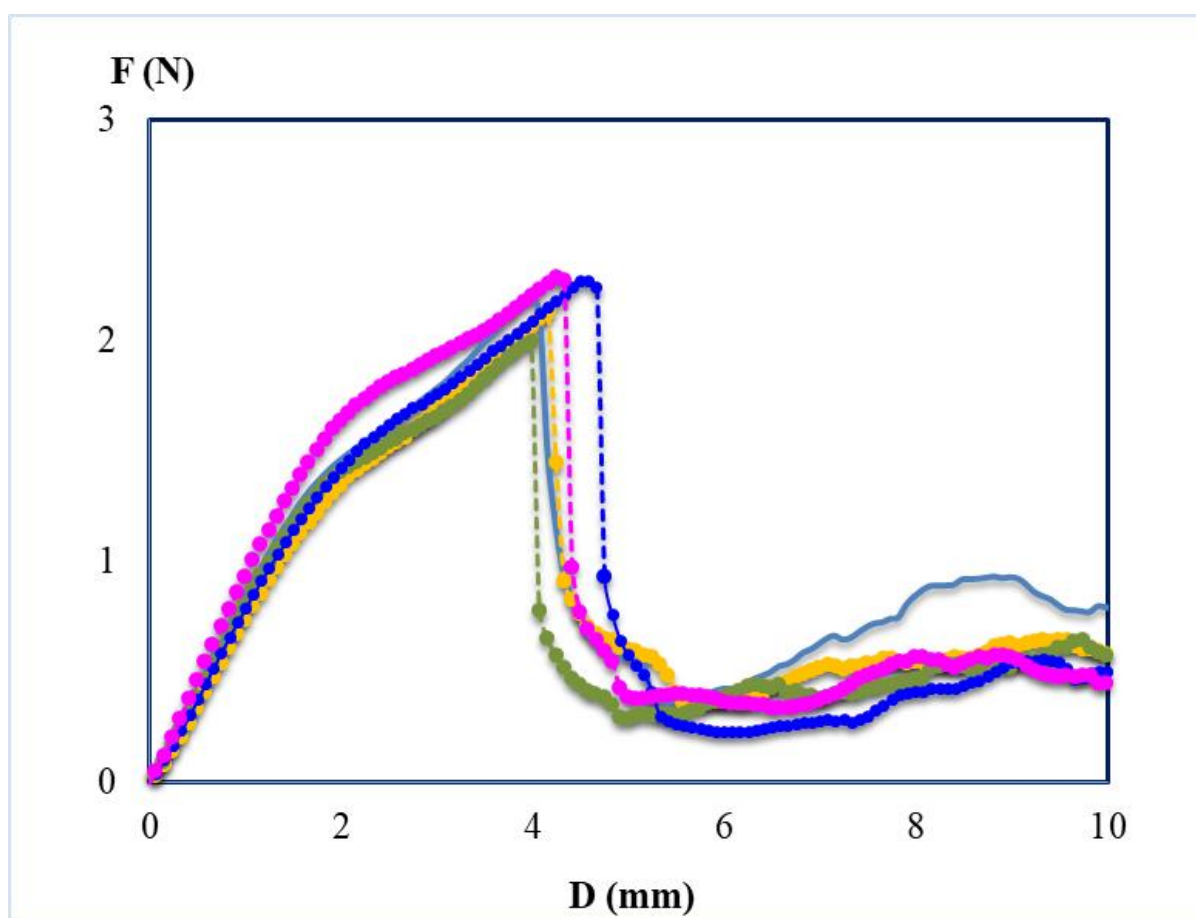


Figura 4-1-5. Curvas Fuerza vs. Desplazamiento típicas de arándanos frescos FF (●) y expuestos a distintas concentraciones de ozono: 3,0 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 15 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 30 min (●).

En la **Tabla 4-4** se muestran los valores medios de los parámetros mecánicos obtenidos para los frutos control y los tratados con ozono en fase acuosa: fuerza máxima de ruptura (F_R), desplazamiento correspondiente a la F_R (D_R), trabajo (W) necesario para romper el epicarpo y rigidez (R_i).

Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza multivariado (MANOVA). Previo a este análisis, se evaluó el grado de asociación entre las variables estudiadas con un análisis de correlación. El trabajo (W) presentó correlación significativa ($p < 0,001$) con F_R ; por lo tanto esta variable fue excluida del análisis multivariado ($r = 0,84$ y $r = 0,83$, coeficiente de asociación lineal de Pearson y coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, respectivamente).

El análisis estadístico realizado señaló que hubo interacción significativa ($F_{12, 659} = 2,37$; $p = 0,0050$) entre los factores concentración y día de almacenamiento. Sin embargo según el análisis de varianza realizado, las propiedades mecánicas no variaron significativamente entre los FF y los frutos tratados.

Se puede observar que el comportamiento mecánico de los frutos de arándano fue similar independientemente del tratamiento aplicado. Los valores de F_R no variaron significativamente entre las muestras control y tratadas, así como tampoco durante el almacenamiento. A partir del día 5 se observó en todas las muestras un mínimo aumento de los valores de F_R y D_R y por ende de W . El valor de R_i en términos generales permaneció invariable desde el día 0 hasta el día 15 de almacenamiento.

El mínimo aumento observado en la cantidad de energía necesaria (W) para romper la epidermis de la fruta a partir del día 5 de almacenamiento podría asociarse a los procesos fisiológicos de maduración propios de la fruta, así como a la pérdida de agua observada en las mismas.

Con el objetivo de profundizar los resultados hasta acá descriptos para este ítem, se realizó un análisis de función discriminante (AFD), a partir del cual se obtuvo 3 funciones discriminantes o ejes canónicos.

En las **Tablas 4-5 y 4-6** se reportan los valores de los autovalores de la matriz grupos y las funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común.

Tabla 4-4. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de F_R , D_R , W y R_i de los frutos de arándanos frescos y tratados con distintas concentraciones de ozono ($3,0$ y $5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$) a diferentes tiempos de exposición (10 , 20 y 30 min) y almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	F_R (N)	D_R (mm)	W (mJ)	R_i (N/mm)	
0	FF	$2,3 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,6$	$5,5 \pm 1,6$	$0,9 \pm 0,3$	a,b,c
	$3,0$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,3 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,6$	$5,7 \pm 1,9$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min	$2,2 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,8$	$5,7 \pm 1,9$	$0,8 \pm 0,2$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,9$	$5,5 \pm 1,7$	$0,9 \pm 0,3$	a,b
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 30 min	$2,3 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,0$	$6,1 \pm 2,0$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
5	FF	$2,2 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,6$	$5,2 \pm 1,7$	$0,7 \pm 0,3$	b,c
	$3,0$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,2 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,9$	$5,7 \pm 1,8$	$0,7 \pm 0,2$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min	$2,6 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,6$	$6,8 \pm 1,4$	$0,9 \pm 0,2$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,5 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,8$	$6,9 \pm 1,2$	$0,9 \pm 0,2$	a
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 30 min	$2,4 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,8$	$6,5 \pm 1,6$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
10	FF	$2,3 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,8$	$6,4 \pm 1,8$	$0,7 \pm 0,3$	a,b,c
	$3,0$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,4 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,7$	$6,1 \pm 2,2$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min	$2,3 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,8$	$6,2 \pm 2,0$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,4 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,9$	$6,4 \pm 1,8$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 30 min	$2,5 \pm 0,6$	$4,4 \pm 0,8$	$6,4 \pm 1,7$	$0,8 \pm 0,3$	a,b
15	FF	$2,5 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,8$	$6,4 \pm 2,1$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$3,0$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,4 \pm 0,8$	$4,4 \pm 0,7$	$6,0 \pm 2,0$	$0,8 \pm 0,3$	b
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min	$2,5 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,8$	$6,3 \pm 2,0$	$0,9 \pm 0,4$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 20 min	$2,3 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,9$	$5,7 \pm 1,8$	$0,8 \pm 0,3$	a,b,c
	$5,1$ $\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 30 min	$2,5 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,8$	$6,2 \pm 1,9$	$0,9 \pm 0,2$	a,b,c

Los resultados fueron expresados como el promedio ($n = 30$) \pm la desviación estándar de la muestra. Los valores promedio de una misma fila identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Tablas 4-5 y 4-6. Autovalores y funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común correspondientes al análisis AFD de los estimadores de los parámetros obtenidos de la curvas de fuerza-desplazamiento de arándanos frescos y tratado con ozono en fase acuosa a 3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹ a distintos tiempos (10,20 y 30 min).

Tabla 4-5

Autovalores			
Función discriminante	Valor	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	0,09	49,91	49,91
2	0,06	34,04	83,96
3	0,03	16,04	100

Tabla 4-6

Funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común			
	1	2	3
F _R	-2,06	0,03	0,32
D _R	0,95	1,06	-0,52
R _i	2,19	0,81	0,43

La primera función discriminante del AFD explicó el 49,91 % de la variabilidad de los datos, mientras que la segunda función discriminante explicó el 34,04 %. Ambas funciones explicaron el 83,96 % acumulado de la variabilidad total entre todos los tratamientos (**Tabla 4-5**). En la **Tabla 4-6** puede observarse que las variables R_i y F_R en la primera función discriminante presentaron los mayores valores absolutos respectivamente y por lo tanto fueron las variables de mayor poder discriminante entre los tratamientos. En cambio D_R fue la variable con mayor aporte en la segunda y tercera función discriminante.

En la **Figura 4-1-6** se representa la clasificación de los tratamientos correspondientes a la primera y segunda función discriminante, así como la primera y tercera función discriminante. Debido a que las muestras (independientemente del tratamiento) se distribuyeron como una gran nube de puntos, se graficaron solamente los centroides correspondientes a cada uno de los tratamientos para visualizar mejor los resultados obtenidos en el AFD. En concordancia con el MANOVA, el AFD no clasificó correctamente los tratamientos; solamente un 10 % del total de todas las muestras (n = 680) fueron clasificados en sus respectivos grupos. Esta clasificación era esperable debido a que, como no se observaron diferencias significativas entre los parámetros mecánicos de los distintos tratamientos, los mismos no mostraron una tendencia clara para agruparse o clasificarse.

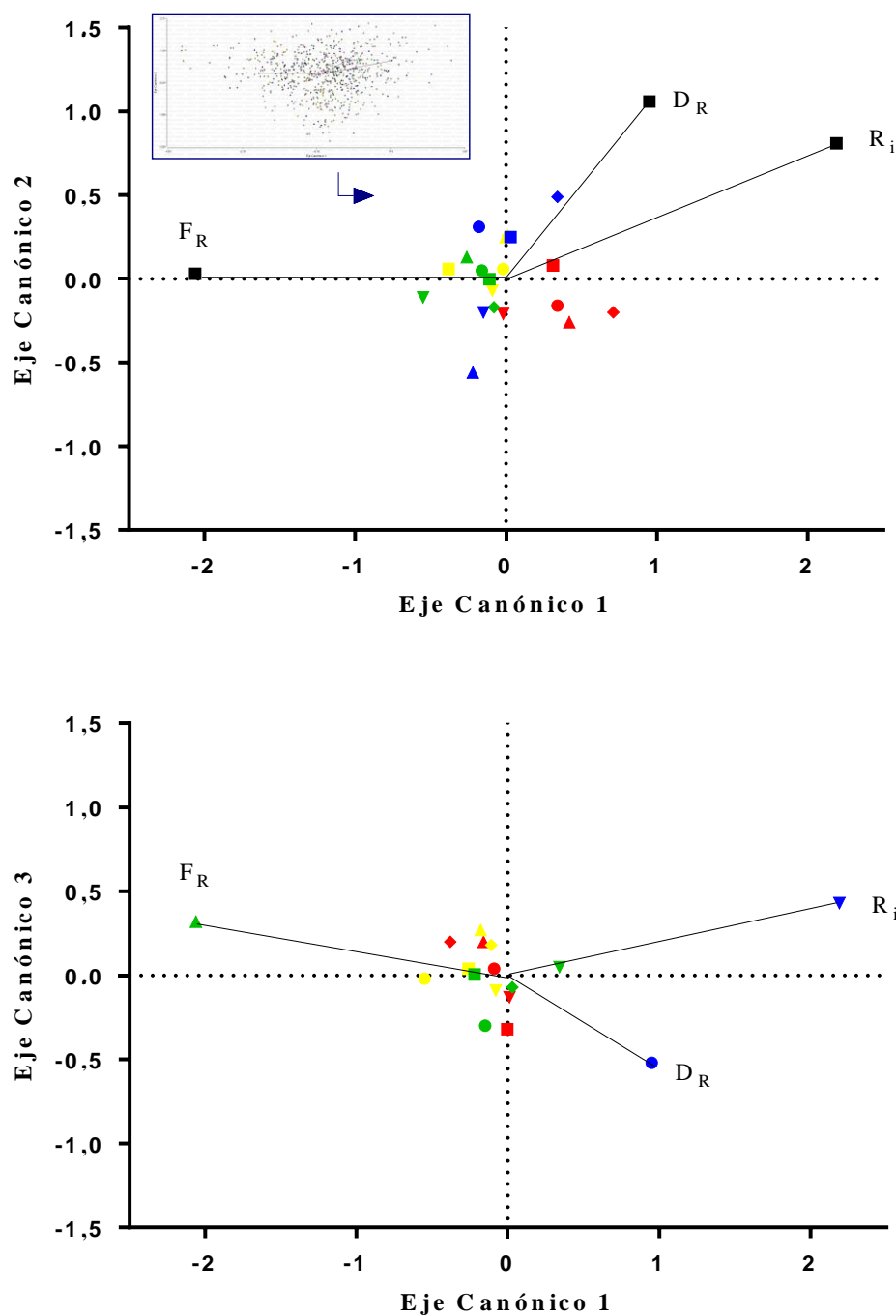


Figura 4-1-6. Centroides del análisis discriminante correspondiente a los estimadores de las propiedades mecánicas obtenidos a partir de los ensayos de punción de arándanos frescos FF (\blacktriangle) y expuestos a distintas concentraciones de ozono: 3,0 mg $O_3.L^{-1}$ 20 min (\blacktriangledown); 5,1 mg $O_3.L^{-1}$ 15 min (\bullet); 5,1 mg $O_3.L^{-1}$ 20 min (\blacklozenge); 5,1 mg $O_3.L^{-1}$ 30 min (\blacksquare). Almacenados durante 0 (\color{red}), 5 (\color{blue}), 10 (\color{yellow}) y 15 (\color{green}) días.

En la **Figura 4-1-6**, se puede observar que los centroides correspondientes a cada tratamiento están distribuidos indistintamente cerca del valor 0 en cualquiera de los ejes canónicos que se observe; solamente en la representación gráfica del eje canónico 1 vs. eje canónico 2 se puede observar una ligera tendencia a clasificarse todas las muestra (FF y tratadas) correspondientes al día 0 en el eje positivo de la función discriminante 1.

Estos resultados no parecieran ser paralelos con los cambios observados en la microestructura de los arándanos (**ítem 4.1.3.1**). Es bien sabido que la organización y composición de la PTE, así como la presión de turgor dentro de las células individuales, la rigidez de la pared celular y la adhesión célula-célula (determinada por la integridad de la laminilla media y los plasmodesmas) son los factores estructurales más importantes que determinan las características reológicas de las bayas (Jackman y Stanley, 1995; Waldron y col., 1997; Alzamora y col., 2008; Lara y col., 2014). Sería de esperar que las alteraciones en la PTE de los frutos de arándano (disrupciones en la PTE y en las paredes celulares de la epidermis; menor tinción en la cutícula y la capa de celulosa; incremento en los espacios entre las capas subepidérmicas) inducidas por el ozono y / o el almacenamiento se verían reflejadas en valores menores de la F_R y D_R . El mantenimiento de los valores de los parámetros mecánicos estudiados podría atribuirse parcialmente a efectos estructurales opuestos: contracción de la epidermis frente a las microfisuras en la PTE y las paredes celulares. El efecto no significativo del tratamiento con ozono y / o el almacenamiento en los parámetros mecánicos evaluados también podría asociarse a la alta variabilidad biológica dentro y entre las bayas, ya sea en los frutos frescos o en los frutos ozonizados, lo cual se tradujo en curvas penetrométricas (F vs D) muy variables y, por consiguiente, en grandes desviaciones estándar (Alzamora y col., 2008).

Además, los cuatro parámetros mecánicos que fueron seleccionados para describir el comportamiento mecánico de los frutos no representaron toda la curva fuerza-desplazamiento. En particular, no tuvieron en cuenta la región correspondiente al desplazamiento de la sonda después de la ruptura de la epidermis, relacionada con la subepidermis y el mesocarpo de los frutos. A pesar de la notoria variabilidad, los valores de fuerza necesarios para penetrar la subepidermis y la pulpa del arándano (mesocarpo) fueron claramente mayores para las bayas control (FF) (flechas, **Figura 4-1-7, a**) que para las ozonizadas (**Figura 4-1-7, b-d**).

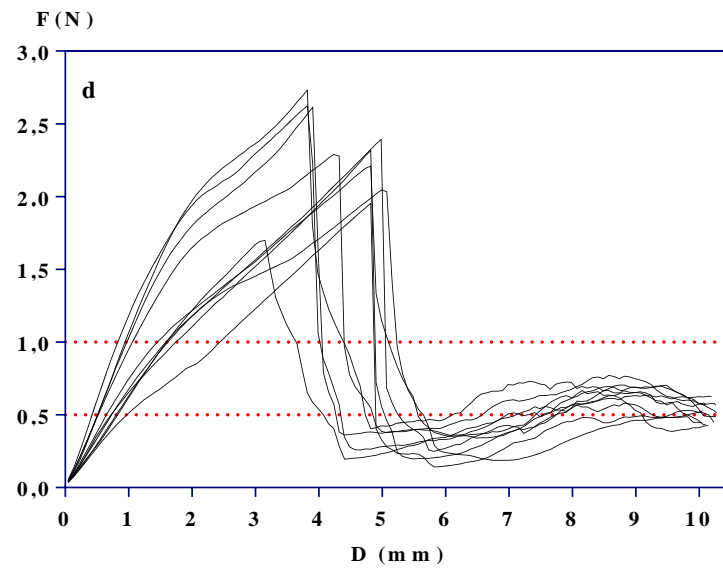
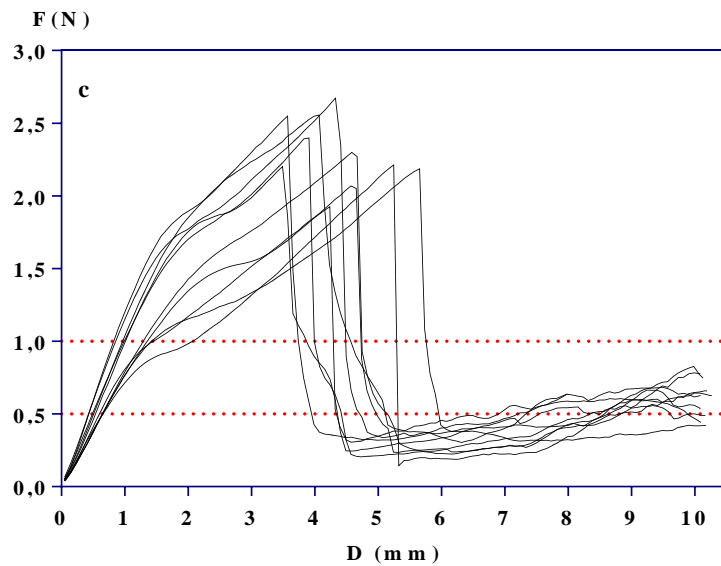
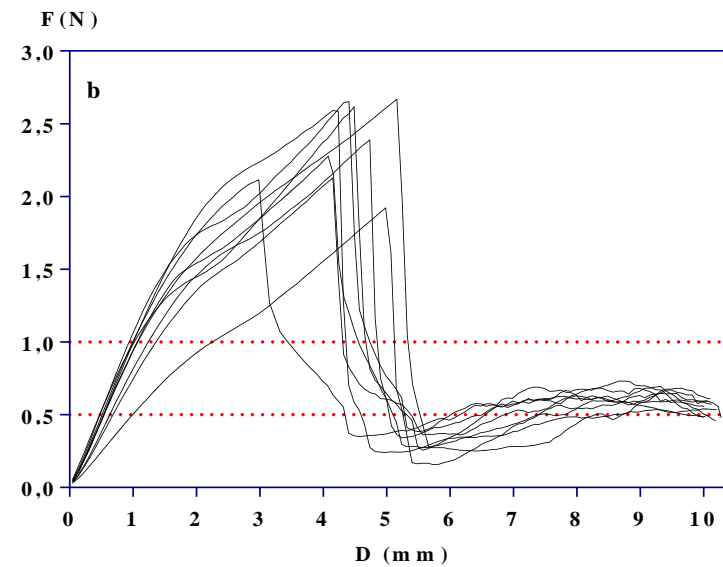
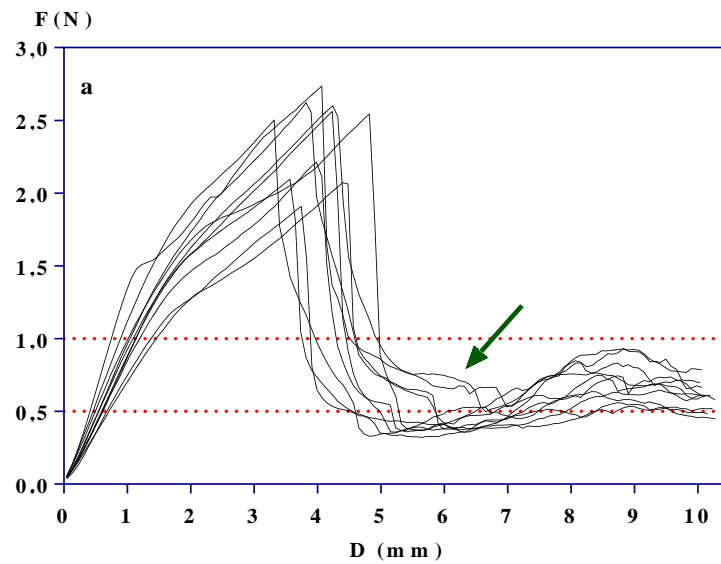


Figura 4-1-7. Curvas Fuerza vs. Desplazamiento típicas de arándanos frescos (FF) y ozonizados correspondientes al día 0 de almacenamiento: (a) FF; frutos ozonizados: (b) 3,0 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, 20 min; (c) 5,1 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, 20 min; (d) 5,1 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, 30 min. → Fuerza necesarios para penetrar la subepidermis y la pulpa del arándano (mesocarpo).

El desprendimiento de la epidermis de las capas subepidérmicas y el mesocarpo y el aumento en los espacios intercelulares se traduciría en una menor resistencia a la penetración de la sonda en los tejidos debajo de la epidermis de los frutos ozonizados en comparación con los FF.

En los arándanos, la textura está fuertemente asociada con el concepto de frescura y calidad. Se sabe que los cambios en la composición química de la pared celular, así como en la estructura del tejido durante el crecimiento, la maduración y la senescencia de los frutos causan variaciones en las propiedades físicas de los arándanos, las cuales están asociadas directamente con el ablandamiento de la fruta (Vicente y col., 2007; Fava y col., 2011; Giongo y col., 2013; Giongo y col., 2017).

Los efectos del ozono en fase acuosa sobre las propiedades mecánicas de frutas han sido reportados en escasos estudios. Específicamente en arándano, hasta el momento de la realización de esta tesis, no se había encontrado información en la literatura. Contigiani y col. (2018) evaluaron el efecto del agua ozonizada ($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$, 5 - 15 min) sobre las propiedades mecánicas de la frutilla. Estos autores no encontraron diferencias significativas entre los parámetros mecánicos de las muestras tratadas y las muestras control inmediatamente después del tratamiento, así como durante el almacenamiento. Sin embargo, los valores de los parámetros de frutas ozonizadas y control al día 0 fueron significativamente distintos al día 12. Los valores de deformación correspondientes a la ruptura de la epidermis se incrementaron y los valores del módulo de deformabilidad disminuyeron, indicando tejidos más deformables y menos rígidos. Los autores señalaron que dicho comportamiento podría atribuirse principalmente a las reacciones metabólicas de maduración y senescencia propias de la fruta. Aday y col. (2014) reportaron resultados distintos a lo antes mencionado; los mismos evaluaron la firmeza de las frutillas durante el almacenamiento (4 semanas, 4°C) después de haber sido sumergidas durante 2 - 5 min en agua ozonizada a distintas concentraciones ($0,075$ y $0,15 \text{ mg O}_3.\text{L}^{-1}$). Las muestras tratadas presentaron mayores valores de firmeza que los frutos control.

En literatura, los trabajos sobre el efecto del ozono en fase gaseosa en productos frutícolas reportan resultados similares entre ellos. El ozono en fase gaseosa, además de tener gran importancia en el control de la flora microbiana, interviene en la disminución de la concentración de etileno (fitohormona de la maduración) en el aire de las cámaras de almacenamiento (Dickson y col., 1992; Bataller-Venta y col., 2010). Ali y col. (2014) evaluaron el efecto del ozono gaseoso fumigado en papaya ($1,5 - 5 \text{ mg O}_3.\text{L}^{-1}$) durante 96 h previo al almacenamiento de esta fruta ($25 \pm$

3 °C y HR = 70 ± 5%, 14 días). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y sin tratar. Las frutas ozonizadas después de 10 días de almacenamiento mostraron un aumento en la firmeza comparadas al control, lo cual fue atribuido al retardo en los procesos asociados a la maduración de la papaya por acción del ozono. Tzortzakis y col. (2007) reportaron que el tomate almacenado en atmósferas enriquecidas con ozono (0,05-1 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$) permaneció sustancialmente más firme que la fruta almacenada en aire filtrado.

4.1.4.3 Pérdida de peso

El porcentaje de pérdida de peso [PP (%)] de los frutos de arándano fue determinado de acuerdo a lo establecido en el ítem **3.8.3**.

En la **Figura 4-1-8** se muestran los porcentajes de pérdida de peso (PP, %) de las muestras FF y las muestras ozonizadas a lo largo del almacenamiento. Los frutos de arándano, tanto los frescos como los tratados con ozono, mostraron una disminución de peso durante este período.

El PP (%) de los arándanos ozonizados en las dosis evaluadas se incrementó conforme aumentó la concentración de ozono, el tiempo de exposición y/o el tiempo de almacenamiento. A los tiempos ensayados, el menor valor de PP (%) se observó en los frutos de arándano control al día 5 ($0,4 \pm 0,3$) de almacenamiento y el mayor valor de PP (%) se obtuvo en los frutos sometidos a 5,1 $\text{mg O}_3.\text{L}^{-1}$ durante 30 min después de 15 días de almacenamiento ($3,1 \pm 0,7$).

El análisis estadístico realizado por comparación de modelos lineales generales mixtos (GLMMs) no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{8, 250} = 0,93$; $p = 0,4942$), es decir, las diferencias entre tratamientos no se modificaron con el tiempo.

Al contrastar los tratamientos, el análisis indicó diferencias significativas ($F_{4, 250} = 32,05$; $p < 0, 0001$) en el PP (%) entre las muestras FF y las muestras expuestas a 3,0 y 5,1 $\text{mg O}_3.\text{L}^{-1}$. El PP (%) de las muestras ozonizadas fue significativamente superior a las muestras FF en todos los tratamientos evaluados. Se observó diferencias significativas entre los frutos ozonizados: el PP (%) en las muestras tratadas con 5,1 $\text{mg O}_3.\text{L}^{-1}$ durante 20 y 30 min resultó significativamente superior al de las muestras tratadas con 3,0 y 5,1 $\text{mg O}_3.\text{L}^{-1}$ durante 20 y 15 min, respectivamente.

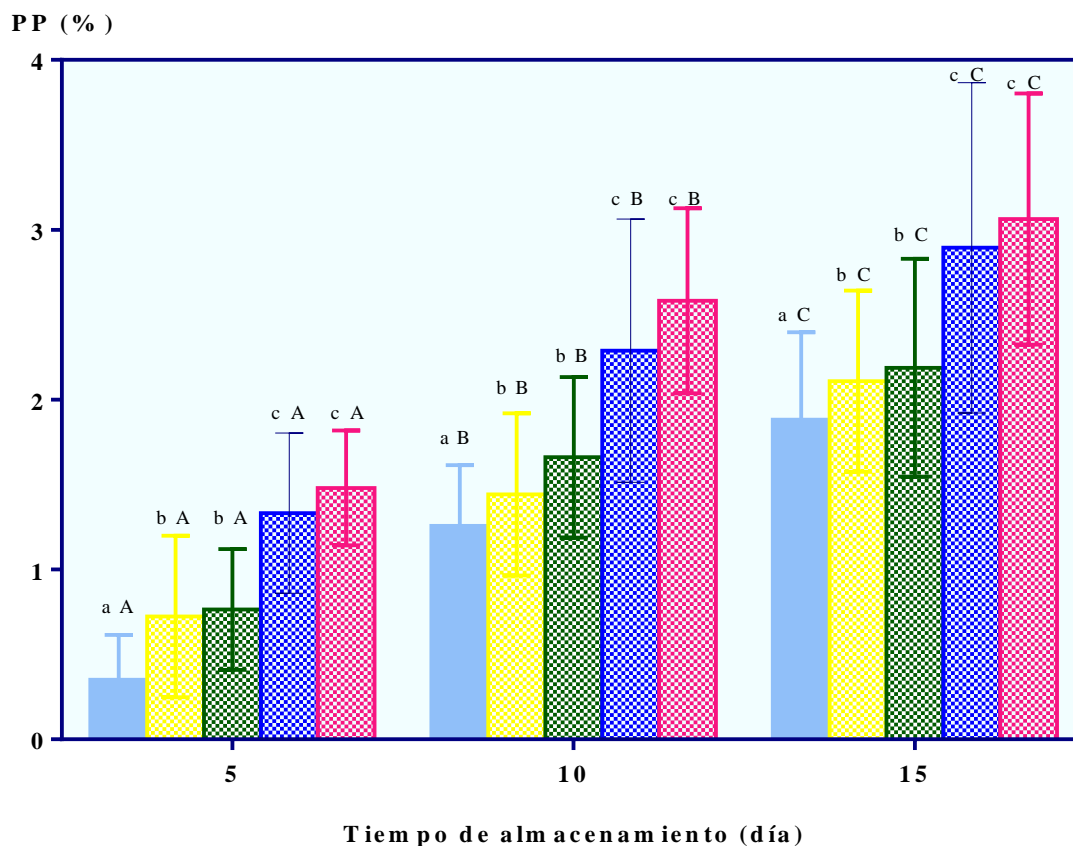


Figura 4-1-8. Valores promedios del PP (%) de arándanos frescos FF (●) y expuestos a distintas concentraciones de ozono: 3,0 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 15 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 30 min (●). Almacenados a 4 ± 1 °C, durante 15 días. Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Durante el almacenamiento en refrigeración (4 ± 1 °C) el PP (%) se incrementó significativamente ($F_{2, 250} = 389,6$; $p < 0, 0001$) conforme aumentaron los días de almacenamiento (5, 10 y 15 días). En los arándanos tratados con una concentración de 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 20 y 30 min, el PP (%) fue entre un 0,5 a 0,7 % y un 0,7 a 0,9 % mayor respectivamente, en comparación a los frutos tratados con 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 15 min, independientemente del tiempo de almacenamiento.

La literatura reporta que la pérdida de peso en las bayas tiene una estrecha relación con la integridad de la cutícula y las ceras epicuticulares, ya que éstas por su naturaleza hidrofóbica y conjuntamente con la cutina, constituyen una barrera que limita la pérdida de agua en las mismas

(Heredia, 2003; Järvinen y col., 2010; Lara y col., 2014). Por lo tanto, los resultados acá obtenidos podrían estar relacionados con las alteraciones observadas en la microestructura de la pared tangencial externa y las células epidérmicas, descritos en los **ítems 4.1.3 y 4.1.4.**, a saber: a- microrupturas y menor tinción de la PTE, indicando alteración de los polisacáridos, lo que favorecería la difusión de agua a través de las capas más externas de la PTE; b- ruptura de paredes de células epidérmicas, lo que facilitaría el transporte de agua al exterior de las células; c- disminución del espesor y redistribución de ceras epicuticulares, que disminuirían el espesor de la capa hidrofóbica incrementando la transferencia de agua al exterior. Dichos cambios en la microestructura y la ultraestructura de los frutos se incrementaron con la concentración de ozono, el tiempo de exposición (a ozono o al lavado) y la duración del almacenamiento, pudiendo esto correlacionarse con la magnitud del PP (%) registrado.

En la bibliografía se reportan pocos informes sobre la pérdida de peso de arándanos tratados con ozono en fase acuosa. Tzortzakis y col. (2007) observaron tasas de pérdida de peso significativamente bajas (respecto al control) en tomates expuestos a altas concentraciones de ozono ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$); sin embargo, se encontró que los tomates no se vieron afectados por el tratamiento cuando éstos fueron expuestos a bajas concentraciones de ozono ($0,05 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Estudios llevados a cabo en ciruelas 'Casselman' tratadas con diferentes concentraciones de ozono gaseoso ($0,034$; $0,050$; $0,094 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$) informaron diferencias significativas en la disposición de las ceras epicuticulares y el grosor de la cutícula en las ciruelas, en comparación con las frutas control. Las microfotografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido por estos autores revelaron que, luego de los tratamientos con ozono, el patrón de distribución de las ceras epicuticulares se vio alterado y a su vez esto dependió de la dosis de ozono aplicada. Las fotomicrografías de MO, por otra parte, indicaron que los frutos tratados con la menor concentración de ozono presentaron una cutícula más gruesa y continua que aquellos ozonizados con la concentración mayor. La epidermis de las ciruelas tratadas con la concentración intermedia presentó una combinación de partes de cutícula fina y gruesa. Sugirieron que el efecto del ozono en la cutícula y las ceras contribuyó a la pérdida de peso observada en los frutos y que dicha pérdida de peso fue mayor en los frutos ozonizados con la mayor concentración (Crisosto y col., 1993).

Es muy importante tomar en cuenta la dosis de ozono a emplear en los tratamientos de desinfección de estas bayas en relación al PP (%). Se ha mencionado en varios estudios que pérdidas de agua equivalentes al 3 o 5 % del peso fresco del arándano, originan “encogimiento” en

la fruta; la piel se arruga y la apariencia se torna poco atractiva, afectando directamente el valor comercial de este fruto (Figuerola y col., 2010; Seymour y col., 2012)

4.1.4.4 Parámetros y funciones colorimétricas

Se analizaron los cambios en el color de los frutos frescos y tratados con ozono a distintas concentraciones (3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹) y tiempos de exposición (10, 15 y 20 min), almacenados durante 15 días a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, según lo descrito en el **ítem 3.8.4**.

Los valores medios de los parámetros L*, a*, b* y de las funciones de color C* y h obtenidos para muestras frescas y tratadas se muestran en la **Tabla 4-7**.

Para el análisis estadístico de cada uno de los parámetros de color se realizó una comparación de modelos lineales generales mixtos (GLMMs). Los parámetros L*, b*, C* y h mostraron interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{12, 372} = 15,07$, $p < 0,0001$; $F_{12, 372} = 6,06$, $p < 0,0001$; $F_{12, 372} = 8,01$, $p < 0,0001$; $F_{12, 372} = 3,23$, $p < 0,0002$, respectivamente). Por el contrario el parámetro a* no mostró interacción significativa entre los factores ya mencionados ($F_{12, 372} = 1,19$, $p = 0,2901$).

El análisis estadístico señaló diferencias significativas para el parámetro L*, entre muestras ozonizadas a diferentes concentraciones o entre muestras ozonizadas y los FF. Durante el almacenamiento los FF y los tratados con ozono mantuvieron los valores de L* prácticamente invariables hasta el día 10, al día 15 los valores de L* de todas las muestras disminuyeron ligera pero significativamente respecto a los días anteriores. A pesar de esto, si se observa los resultados para la luminosidad en la **Tabla 4-7**, los valores de L* son similares entre todas las muestras (FF y en los frutos tratados), su variación va solamente desde 28 ± 1 hasta 24 ± 2 , en una escala que comprende valores entre 0 y 100. Este comportamiento podría estar asociado a una ligera disminución de las ceras durante el almacenamiento.

Tabla 4-7. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de los parámetros y funciones de color de los frutos de arándano fresco y tratados con distintas concentraciones de ozono en fase acuosa (3,0 y 5,1 mg O₃.L⁻¹) a diferentes tiempos de exposición (10, 20 y 30 min) y almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	L*	a*	b*	C*	h
0	FF	24,7 ± 1,7 a	0,40 ± 0,12 a,A	-2,4 ± 0,5 a	2,3 ± 0,4 a	287,2 ± 7,1 a
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	27,5 ± 0,9 d	0,38 ± 0,16 a,A	-2,5 ± 0,7 a	2,5 ± 0,7 a	279,6 ± 5,8 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	26,3 ± 0,9 b	0,44 ± 0,12 b,A	-2,1 ± 0,5 a	2,1 ± 0,5 a	283,4 ± 5,3 a
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	26,3 ± 1,4 b	0,39 ± 0,11 a,A	-2,3 ± 0,6 a	2,4 ± 0,6 a	280,2 ± 3,3 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 30 min	27,6 ± 0,9 d	0,36 ± 0,15 b,A	-2,4 ± 0,6 a	2,5 ± 0,6 a	279,8 ± 5,4 b
5	FF	25,5 ± 1,9 c	0,39 ± 0,10 a,A	-2,3 ± 0,6 a	2,3 ± 0,6 a	281,2 ± 5,3 b
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	26,6 ± 1,2 b	0,36 ± 0,15 a,A	-2,2 ± 0,6 a	2,2 ± 0,6 a	280,5 ± 4,7 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	26,7 ± 1,5 b	0,38 ± 0,15 b,A	-2,1 ± 0,6 a	2,2 ± 0,6 a	281,4 ± 4,0 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	27,4 ± 1,0 d	0,34 ± 0,12 a,A	-2,1 ± 0,5 a	2,2 ± 0,5 a	280,0 ± 4,2 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 30 min	26,9 ± 1,3 b	0,40 ± 0,16 b,A	-2,2 ± 0,7 a	2,2 ± 0,7 a	281,8 ± 6,3 b
10	FF	27,4 ± 0,9 d	0,32 ± 0,12 a,A	-2,3 ± 0,6 a	2,4 ± 0,6 a	279,0 ± 4,9 b
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	26,3 ± 1,4 b	0,35 ± 0,17 a,A	-2,4 ± 0,7 a	2,4 ± 0,7 a	280,1 ± 7,0 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	26,5 ± 1,0 b	0,41 ± 0,14 b,A	-2,0 ± 0,7 a	2,1 ± 0,7 a	282,7 ± 5,0 a
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	27,1 ± 1,0 d	0,31 ± 0,10 a,A	-2,1 ± 0,7 a	2,2 ± 0,7 a	279,4 ± 3,6 b
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 30 min	26,2 ± 1,3 b	0,43 ± 0,18 b,A	-2,0 ± 0,5 a	2,0 ± 0,5 a	283,0 ± 5,0 a
15	FF	24,5 ± 1,8 a	0,49 ± 0,18 a, B	-2,1 ± 0,6 a	2,2 ± 0,6 a	285,3 ± 8,2 a
	3,0 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	25,2 ± 1,5 c	0,46 ± 0,15 a, B	-2,0 ± 0,6 a	2,1 ± 0,6 a	283,5 ± 4,9 a
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	24,5 ± 1,3 a	0,55 ± 0,17 b, B	-2,0 ± 0,7 a	2,1 ± 0,6 a	288,5 ± 7,8 a
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	24,8 ± 1,5 a	0,45 ± 0,15 a, B	-2,2 ± 0,7 a	2,3 ± 0,7 a	282,4 ± 4,6 a
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 30 min	24,1 ± 1,2 a	0,54 ± 0,17 b, B	-2,2 ± 0,7 a	2,3 ± 0,7 a	285,7 ± 8,0 a

Los resultados fueron expresados como el promedio (n = 30) ± la desviación estándar de la muestra.

Los valores promedios de una misma columna identificados con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre días de almacenamiento.

El parámetro **a*** tomo valores positivos cercanos a cero en el rango entre $0,3 \pm 0,2$ y $0,6 \pm 0,2$. Este parámetro, al igual que el parámetro **L*** prácticamente no varió durante los primeros 10 días de almacenamiento; sin embargo para el día 15 los valores de **a*** de todas las muestras evaluadas presentaron un ligero incremento significativo. En general los arándanos tratados con $5,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ozono durante 15 y 30 minutos y almacenados durante 15 días presentaron valores del parámetro **a*** significativamente mayores que las otras combinaciones ozono y tiempo

El parámetro **b*** en todas las muestras analizadas presentó valores negativos, con una ligera predominancia al color azul; sus valores variaron entre $-2,0 \pm 0,7$ y $-2,5 \pm 0,7$ tanto para los FF como para muestras tratadas en el día 0 y durante el almacenamiento. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las condiciones ensayadas, ni durante el almacenamiento.

Para la función **C*** se obtuvieron valores bajos que van desde $2,0 \pm 0,5$ hasta $2,5 \pm 0,6$ en muestras control y tratadas, dichos valores denotan un grado de saturación muy bajo y por tanto un color grisáceo en los frutos. No se observaron diferencias significativas.

La tonalidad del color **h** de los FF y los tratados mostraron valores situados en el tono azul-rojo (entre $279 \pm 5^\circ$ y $288 \pm 4^\circ$), predominando hacia la zona de los azules. En general, no se observaron diferencias significativas en los frutos tratados y FF hasta el día 10 de almacenamiento, al día 15 se observaron valores significativamente más altos en todas las muestras.

En términos generales, a pesar de que varias de las combinaciones presentaron diferencias significativas, no hay un patrón definido de combinaciones para explicar las diferencias en los parámetros y funciones del color, además estas resultaron ser muy pequeñas y no serían apreciables por el consumidor.

El efecto del ozono en los diferentes parámetros de calidad depende de varios factores como la concentración de ozono, tiempo de exposición, fase de tratamiento (en gas o disuelto en agua), matriz vegetal, entre otros. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan parcialmente con los obtenidos por Bialka y Demirci (2007). Estos autores no observaron diferencias significativas en los valores de **L***, **a*** y **b*** de las muestras ozonizadas y las control. Aday y Caner (2014) observaron un blanqueamiento (incremento en los valores de **L***) en la superficie de frutillas después de ser tratadas con ozono disuelto en agua ($0,075 \text{ mg.L}^{-1}$, 5 min) y almacenadas durante 4 semanas a 4°C . Durante el almacenamiento, los valores de **L*** no variaron entre la primera y la cuarta semana. Resultados similares fueron observados por Horvitz y Cantalejo (2012) en pimientos rojos cortados: los valores de **L*** se incrementaron cuando las muestras fueron tratadas

con agua ozonizada ($1 \mu\text{L.L}^{-1}$, 1 - 5 min). Estos autores mencionaron que los cambios en los valores de L^* durante el almacenamiento prodian ser un indicativo de procesos de oxidación o cambios en el tipo y concentración de pigmentos.

Por otra parte Onopiuk y col. (2017) evaluaron el impacto del ozono en fase gaseosa ($0,3 - 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$, 60 - 120 min) en los parámetros de color de las frutas de frambuesa. No observaron diferencias significativas en los parámetros a^* y b^* , mientras que los valores de L^* mostraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y las control a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, los autores señalan que estas diferencias fueron muy sutiles y muy pequeñas para ser percibidas por el consumidor, concluyendo que la dosis de ozono aplicada no tuvo impacto en el color superficial de estas frutas.

4.1.5 Compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante.

4.1.5.1 Puesta a punto de la técnica de extracción: selección del solvente de extracción, tiempo de extracción y porcentaje de acidificación del solvente en la extracción.

El método utilizado para la extracción de antocianinas, fenoles y otros compuestos con capacidad antioxidante debe favorecer la extracción de estos compuestos, minimizando cualquier degradación o alteración de los mismos. Son múltiples los factores que pueden afectar su estabilidad, entre ellos: pH, temperatura, tipo de disolvente utilizado y tiempo de extracción.

Como se mencionó en el **ítem 3.9.1**, antes de definir la metodología final de extracción de antocianinas, compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes, se realizó una primera serie de experiencias para evaluar la influencia de algunas variables (relación solvente/agua, pH, tiempo de extracción) en la extracción de los compuestos. A continuación se hace una descripción breve y general de los resultados obtenidos con cada una de las variables modificadas a lo largo de la puesta a punto de la técnica. Las pruebas fueron realizadas con frutos de arándano fresco adquiridos en el comercio durante los meses de Junio y Julio de 2016. El cultivar era desconocido.

Teniendo en cuenta lo reportado por otros autores, para la extracción de antocianinas, compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes del tejido de arándano, se utilizó inicialmente

como solvente de extracción (SE) una solución que contenía etanol y HCL al 0,1 % v/v ($\text{pH} = 2,0 \pm 0,1$) y una relación fruta/solvente de extracción de 1:10 (m/v). La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rios de Souza y col. (2014) y Giovanelli y Buratti (2009), con ligeras modificaciones.

En una primera etapa se evaluaron tres relaciones de **etanol/agua (v/v): 50:50; 80:20 y 90:10**. Las muestras junto con el SE fueron agitadas a temperatura ambiente en tres etapas diferentes y luego centrifugadas (**ítem 3.9.1**; etapas 1, 2 y 3) para obtener un extracto libre de pulpa (**Prueba 1**). Se midió el contenido de antocianinas y los resultados obtenidos fueron: $67,9 \pm 1,7$; $74,1 \pm 1,0$ y $85,4 \pm 5,4$ mg cia-3-glucósido/100 g de fruta, respectivamente. Se observó que la extracción de antocianinas fue aumentando conforme aumentó el contenido de alcohol en el SE; por tanto el mayor contenido se obtuvo con la relación etanol/agua 90:10.

Simultáneamente se hizo otro ensayo en condiciones similares a las descritas anteriormente, solamente que en lugar de agitar las muestras junto con el SE en etapas diferentes, las mismas, una vez agregado el SE, se dejaron inmediatamente en reposo en la heladera a 4°C durante 24 h en completa oscuridad; transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas y se obtuvo el extracto (**Prueba 2**). El contenido de antocianinas para las diferentes relaciones de etanol/agua (v/v) ensayadas (50:50; 80:20; y 90:10) fue de $70,0 \pm 0,1$; $75,5 \pm 5,7$ y $86,1 \pm 1,5$ mg cia-3-glucósido/100 g de fruta, respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el contenido de antocianinas para cada una de las relaciones del SE fueron similares a los obtenidos en la Prueba 1. Sin embargo, el tiempo que implicaba la extracción de los distintos compuestos de esta forma fue muy extenso.

En base a los resultados obtenidos hasta este momento, se decidió continuar con los siguientes ensayos usando como SE etanol/agua 90:10 (v/v) y realizar la extracción mediante agitación, ya que el tiempo de extracción de esta forma no superaba las 2 h aproximadamente.

Una vez definida la relación etanol/agua, se procedió a evaluar la influencia del pH, ya que este es uno de los parámetros que influyen en la efectividad de la extracción (Oancea y col., 2013; Zapata y col., 2014). Para variar el pH en el SE se varió el % de HCl. Además del SE que se venía evaluando (0,1 % HCl; $\text{pH} = 2,0 \pm 0,1$), se preparó otro SE con 0,01 % v/v de HCl, resultando el pH de la misma igual a $3,0 \pm 0,1$. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de antocianinas y fenoles fue superior cuando el SE fue menos ácido ($\text{pH} = 3,0 \pm 0,1$); en cambio, la

capacidad antioxidante fue ligeramente mayor con el SE más ácido ($\text{pH} = 2,0 \pm 0,1$) (**Tabla 4-8: prueba 3**). El siguiente ensayo se realizó utilizando etanol/agua 90:10 (v/v) y 0,01 % v/v HCL, ya que la extracción de dos de los tres compuestos a evaluar se veían favorecidos bajo estas condiciones.

Finalmente, en bibliografía varios autores proponen la extracción de antocianinas y fenoles usando un segundo SE: etanol/agua y luego acetona /agua. Se planteó entonces la adición acetona/agua en una relación de 70:30 (v/v) en distintos volúmenes: 20, 30 y 45 mL, se agitó durante 1 h más y se centrifugó. Se observó que la adición de acetona/agua mejoró notoriamente la extracción de antocianinas y fenoles. En la **Tabla 4-8: Prueba 4** se encuentran los valores obtenidos para cada una de las cantidades de acetona usadas: a mayor cantidad de mL de acetona agregada (70:30 (v/v)), mayor fue el % de extracción de antocianinas y fenoles.

Es importante mencionar que debido a la disponibilidad limitada de frutos de arándano durante el año, y a la cantidad necesaria para realizar los diferentes ensayos, desde el inicio de la investigación se planteó obtener un mismo extracto que favoreciera la determinación de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante.

Tabla 4-8. Valores promedio del contenido antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de arándanos frescos utilizados para la puesta a punto de la metodología de extracción de estos compuestos.

	SE (etanol/agua) (v/v)	Antocianinas Totales mg cia-3-glu/100 g	Fenoles Totales mg EAG /100 g	mM ET /100 g
Prueba	3 90/10; 0,1 % HCL	75,6 \pm 0,1 a	196,41 \pm 2,9 a	5,88 \pm 0,39
	90/10; 0,01 % HCL	85,1 \pm 3,5 b	218,41 \pm 7,6 b	4,95 \pm 0,60
	Etanol / acetona (20)	91,83 \pm 1,9 a	230,36 \pm 2,9 a	*
	4 Etanol / acetona (30)	97,34 \pm 1,0 b	241,81 \pm 6,5 a	*
	Etanol / acetona (45)	105,87 \pm 0,5 c	283,60 \pm 13 b	8,62 \pm 0,25

Los resultados fueron expresados como el promedio ($n=3$) \pm la desviación estándar. El análisis estadístico corresponde a cada prueba por separado: medias de una misma columna identificada con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). (*) No se midió la capacidad antioxidante de esas muestras.

Los tratamientos seleccionados para medir los compuestos bioactivos de esta sección se determinaron tomando en cuenta los resultados microbiológicos, así como los resultados obtenidos en la evaluación de los otros parámetros de calidad. Considerando que el tratamiento de 5,1 mg

$\text{O}_3\text{.L}^{-1}$ 10 min fue en general uno de los más efectivos para extender la vida útil de los arándanos y, a su vez, representa uno de los tratamientos con menor tiempo de exposición (condición limitante en la consideración del PP (%)), se propuso entonces medir los valores de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante después de este tratamiento. El tratamiento de $5,1 \text{ mg O}_3\text{.L}^{-1}$ 20 min se consideró también para evaluar el efecto “tiempo de exposición al ozono” sobre los compuestos bioactivos y la CA.

4.1.5.2 Contenido de antocianinas

Los resultados obtenidos del contenido de antocianinas en las muestras analizadas, expresados como miligramos de cianidina-3-glucósido presentes en 100 gramos de masa seca, se muestran en la **Figura 4-1-9** y en la **Tabla 4-9**. Se puede observar que el contenido de antocianinas en los frutos de arándano fue superior en las muestras tratadas con $5,1 \text{ mg O}_3\text{.L}^{-1}$ durante 10 y 20 min, respecto a los FF. A lo largo del almacenamiento dicho contenido disminuyó conforme aumentó su duración.

Se aplicó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y control.

El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{4, 34} = 0,17$; $p = 0,9500$). Al comparar los diferentes tratamientos, el contenido de antocianinas en las muestras tratadas con $5,1 \text{ mg O}_3\text{.L}^{-1}$ fue significativamente superior ($F_{2, 34} = 10,31$; $p < 0, 0003$) respecto al control (FF); sin embargo, entre las muestras ozonizadas durante 10 y 20 min no se observaron diferencias significativas. Durante el almacenamiento, el contenido de antocianinas disminuyó conforme aumentaron los días de almacenamiento, siendo el contenido de antocianinas significativamente menor ($F_{2, 34} = 7,37$; $p < 0, 0022$) en el día 15 de almacenamiento. Si bien en el día 10 de almacenamiento el contenido de antocianinas presentó una ligera disminución con respecto al día 0, esta disminución no fue significativa.

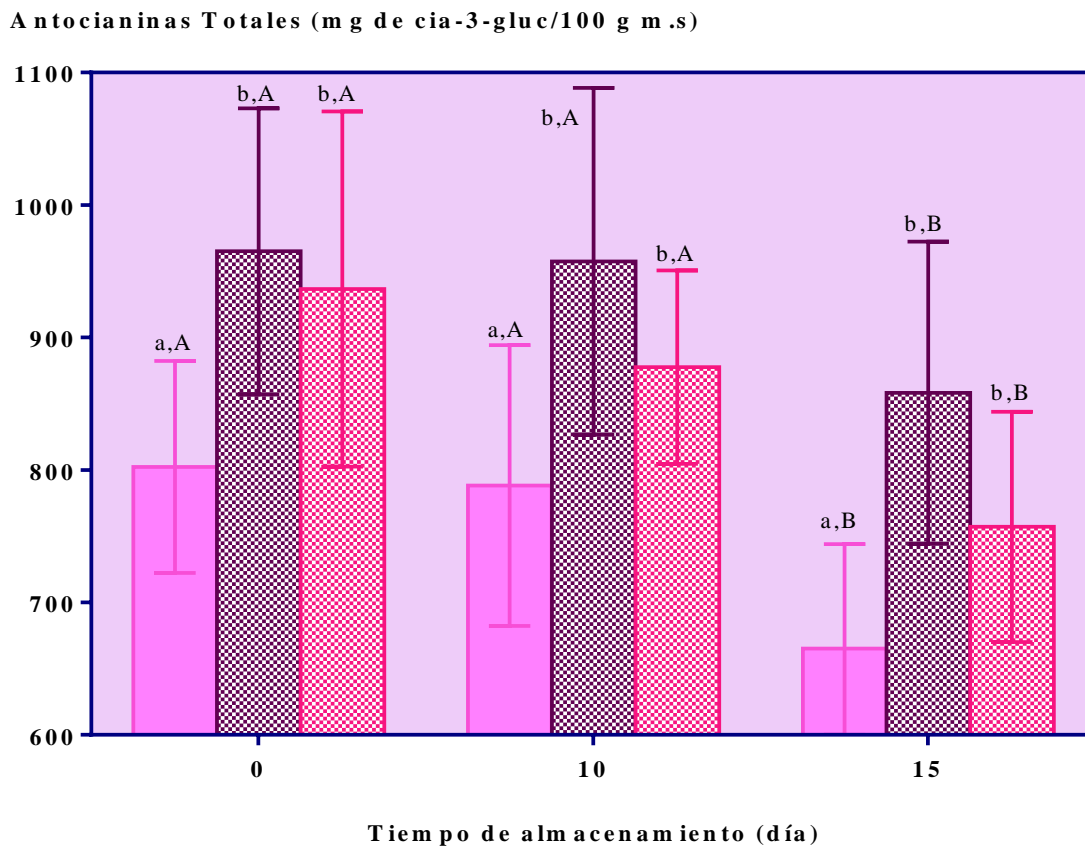


Figura 4-1-9. Valores promedio del contenido antocianinas por cada 100 g de masa seca (mg cia-3-glu/100 g m.s). Frutos frescos FF (●) y expuestos a ozono durante diferentes tiempos: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●). Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

4.1.5.3 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales de las muestras control y las tratadas con 5,1 mg O₃.L⁻¹ ozono en fase acuosa durante distintos tiempos de exposición (10 y 20 min) se muestran en la **Figura 4-1-10** y en la **Tabla 4-9**.

Puede observarse que el contenido de fenoles totales fue superior en los frutos tratados con ozono respecto a los frutos control, en el día 0 y durante el almacenamiento.

Para determinar si hubo diferencias significativas entre las muestras evaluadas, se realizó un ANOVA de dos factores. El análisis estadístico señaló que no hubo interacción significativa ($F_{4,34} = 0,1$; $p = 0,9800$) entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento”.

Tabla 4-9. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar del contenido de antocianinas (mg de cianidina- 3-glucosido), fenoles (mg de EAG) y capacidad antioxidante (mM ET) por cada 100 g de masa seca de arándano fresco (FF) y tratados con 5,1 mg O₃.L⁻¹ a distintos tiempos, almacenados a 4 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	Antocianinas Totales mg cia-3-glu/100 g m.s			Fenoles Totales mg EAG /100 g m.s			ABTS mM ET/100 g m.s			ORAC mM ET/100 g m.s		
0	FF	802,3	± 80	a,A	1477,0	± 191	a,A	54,6	± 4,2	a,A	19,73	± 2,0	a,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	965,0	± 108	b,A	1766,7	± 299	b,A	61,3	± 1,8	b,A	24,87	± 2,6	b,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	936,6	± 134	b,A	1640,1	± 198	a,b,A	59,8	± 3,3	b,A	21,80	± 3,3	a,b,A
10	FF	788,2	± 106	a,A	1408,0	± 130	a,A,B	58,2	± 4,3	a,A	19,93	± 2,3	a,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	957,5	± 131	b,A	1646,9	± 185	b,A,B	60,5	± 4,4	b,A	21,75	± 1,8	b,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	877,5	± 73	b,A	1544,5	± 236	a,b,A,B	61,5	± 5,1	b,A	19,66	± 1,1	a,b,A
15	FF	665,1	± 79	a,B	1319,0	± 68	a,B	54,5	± 0,3	a,A	19,76	± 1,7	a,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	858,3	± 114	b,B	1493,7	± 194	b,B	60,4	± 5,2	b,A	21,85	± 3,3	b,A
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 20 min	757,0	± 87	b,B	1424,2	± 195	a,b,B	58,7	± 2,7	b,A	20,73	± 1,6	a,b,A

Los resultados fueron expresados como el promedio (n = 5) ± la desviación estándar de la muestra. Los valores promedios de una misma columna identificados con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre días de almacenamiento.

El contenido de fenoles totales en las muestras tratadas con $5,1 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ ozono durante 10 min fue significativamente mayor con respecto a los FF ($F_{2,34} = 5,00$; $p = 0,0128$), mientras que las muestras tratadas con $5,1 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ ozono durante 20 min solo tuvieron un leve aumento no significativo respecto a los FF. Se observaron ligeras diferencias no significativas entre muestras ozonizadas durante diferentes tiempos, siendo el contenido de fenoles totales levemente superior en las muestras expuestas el menor tiempo (10 min).

Durante el almacenamiento el contenido de fenoles totales fue disminuyendo respecto al día 0; al día 10 la disminución de estos valores fue leve, mientras que al día 15 la disminución de fenoles totales fue significativa ($F_{2,34} = 4,08$; $p = 0,0263$).

Fenoles Totales (mg EAG /100 g m.s)

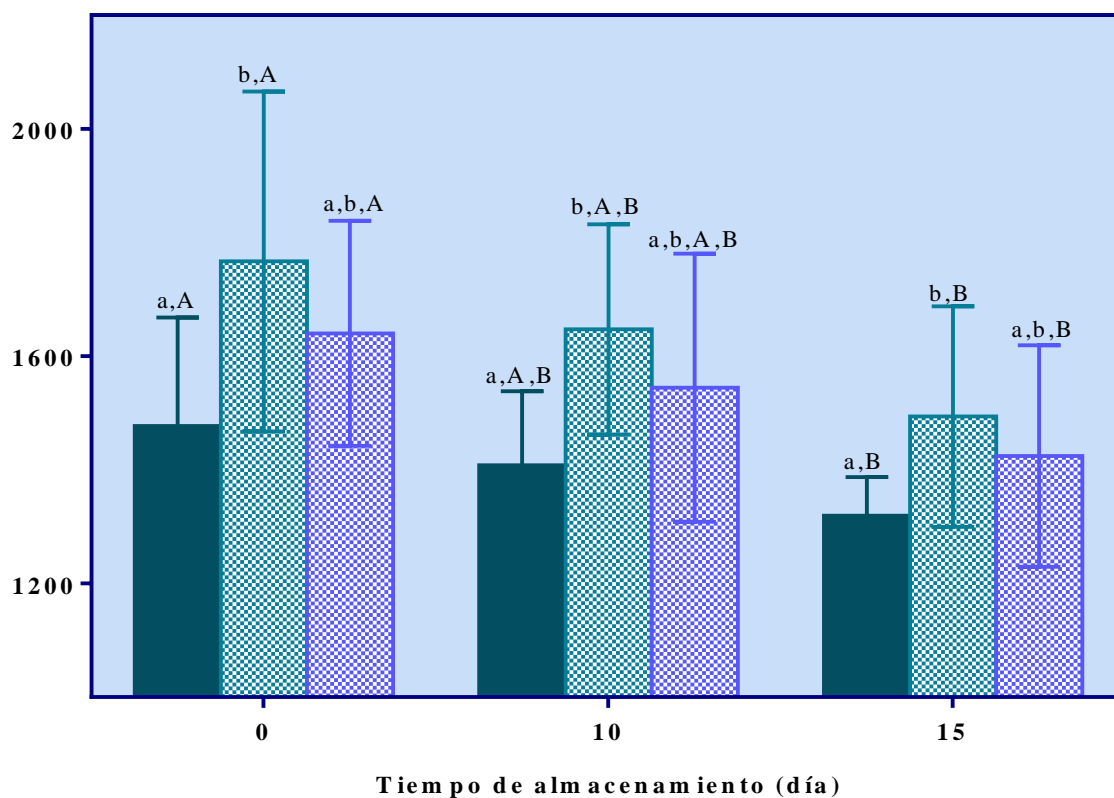


Figura 4-1-10. Valores promedio del contenido de fenoles totales por cada 100 g de masa seca (mg ácido gálico (EAG)/100 g m.s). Frutos frescos FF (●) y expuestos a ozono durante diferentes tiempos: $5,1 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ 10 min (●); $5,1 \text{ mg O}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ 20 min (●). Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

4.1.5.4 Capacidad antioxidante

En general, la capacidad antioxidante (CA) de los frutos en general viene dada por antioxidantes de naturaleza hidrofílica (ácido ascórbico, antocianinas, fenoles) y lipofílica (carotenoides). La CA de los frutos de arándanos frescos y tratados con ozono fue determinada mediante dos metodologías: ABTS y ORAC. El método ABTS permite medir la capacidad antioxidante de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica, mientras que el método ORAC permite la determinación de actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos, que en el caso del arándano representa la mayor parte (antocianinas, fenoles y ácido ascórbico).

Con el objetivo de definir los tiempos de incubación para la evaluación de la CA mediante la técnica de ABTS (**ítem 3.9.4**), se realizó un estudio de la cinética de reacción del radical ABTS[•] con los estándares Trolox y también del radical ABTS[•] con extracto de arándano.

En el primer caso, en la **Figura 4-1-11 a** se puede observar que el porcentaje de inhibición del radical ABTS[•] por parte de los distintos estándares Trolox permaneció prácticamente constante a partir del minuto 30 de reacción (cada curva se realizó por triplicado). Los valores del porcentaje de inhibición obtenidos fueron analizados con un ANOVA de dos factores para establecer si hubo o no diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de Trolox y tiempos de incubación ensayados (15, 30, 45, 70, 90 min). El análisis estadístico no señaló interacción entre los factores tiempo y concentración ($F_{44, 120} = 0,03$; $p > 0,99$). Como era de esperarse el porcentaje de inhibición fue significativamente diferente entre las distintas concentraciones ensayadas ($F_{11, 120} = 245,8$; $p < 0,0001$). Sin embargo, entre los diferentes tiempos de incubación (15, 30, 45, 70 y 90 min) no se observó diferencias significativas en el porcentaje de inhibición ($F_{11, 120} = 1,83$; $p = 0,1268$). Por lo tanto, las diferentes concentraciones de Trolox necesarias para obtener la curva de calibración fueron incubadas durante 30 min.

En cuanto a la cinética de reacción del radical ABTS[•] con el extracto de arándano, en la **Figura 4-1-11 b** se muestra que la estabilización del porcentaje de inhibición del radical por parte de los extractos. Éste se mantuvo prácticamente constante después de 120 min de reacción; por esta razón se estableció que el tiempo de incubación para medir la CA de los extractos de arándano con el método de ABTS sería de 2 h.

La **Figura 4-1-11 c** corresponde a una curva de calibración de Trolox utilizada en la determinación de ABTS; la misma se presenta a modo de ejemplo.

Con respecto a la técnica ORAC, se propusieron diluciones de los extractos que permitieran obtener una cinética completa del descenso de fluoresceína (**Figura 4-1-11 d**), tal como se mencionó en el ítem **3.9.4**. Las diluciones que cumplieron con este requerimiento fueron 1:80 y 1:160.

Método ABTS

Los resultados de los valores obtenidos para el método **ABTS** se muestran en la **Tabla 4-9** y en la **Figura 4-1-12 a**, expresados en mM ET/ 100 g de masa seca.

El análisis estadístico ANOVA de dos factores no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “almacenamiento” ($F_{4,34} = 0,43$; $p = 0,78$). De acuerdo a los resultados obtenidos para este método se puede observar que los valores correspondientes a los frutos tratados con 5,1 mg $O_3 \cdot L^{-1}$ durante 10 y 20 min fueron significativamente superiores a los obtenidos en los FF (10 y 9 %, respectivamente). Las muestras que fueron expuestas a 20 min presentaron valores de capacidad antioxidante ligeramente más bajos que las muestras expuestas a 10 min, excepto para el día 10 en donde el valor de capacidad antioxidante obtenido para ese tiempo (20 min) fue ligeramente superior.

Las muestras FF y las ozonizadas durante 20 min presentaron un leve incremento en su capacidad antioxidante en el día 10, mientras que para el día 15 sus valores disminuyeron hasta valores aproximados a los del día 0. En el caso de las muestras ozonizadas durante 10 min, su capacidad antioxidante permaneció prácticamente invariable durante todo el almacenamiento. A pesar de todas estas variaciones en los valores de la capacidad antioxidante de los frutos tratados y sin tratar, no se observaron diferencias significativas durante el almacenamiento.

Método ORAC

Los resultados de los valores obtenidos para el método **ORAC** se muestran en la **Tabla 4-9** y en la **Figura 4-1-12 b**. Para cada medición se realizó una curva de calibración de Trolox; en la **Figura 4-1-11 e** se muestra a modo de ejemplo una de estas curvas.

El análisis estadístico ANOVA de dos factores no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “almacenamiento” ($F_{4,34} = 1,19$; $p = 0,33$).

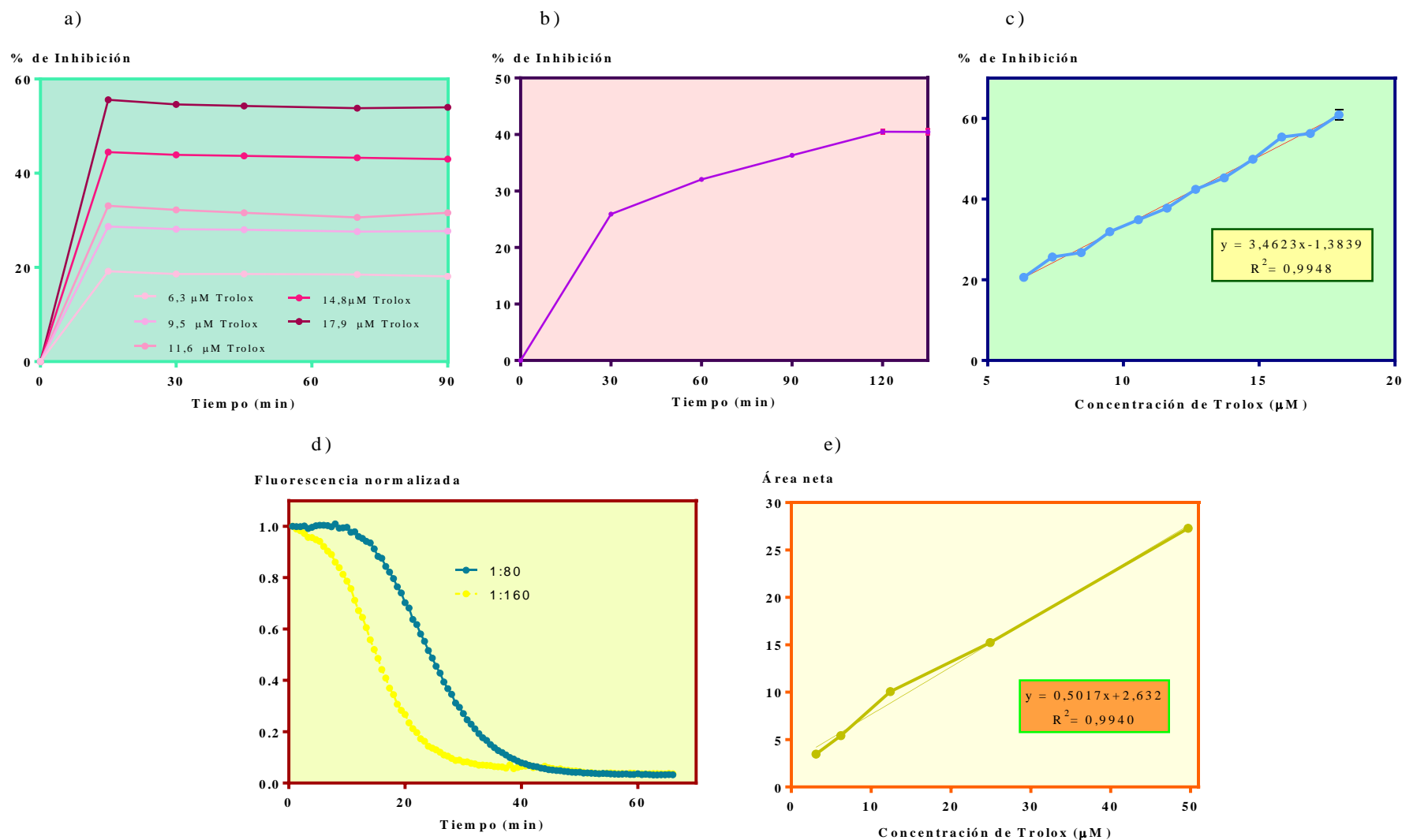


Figura 4-1-11. a) Reacción del radical ABTS[•] con diferentes concentraciones de Trolox (6,3-17,9 μM Trolox); **b)** Reacción del radical ABTS[•] con extracto de arándano **c)** Curvas de calibración de Trolox (n=3) correspondiente a la técnica ABTS **d)** Curvas de descenso de la fluorescencia (inducida por AAPH) en presencia de diferentes diluciones de extracto de arándano (antioxidante) correspondiente a la técnica ORAC. **e)** Curvas de calibración de Trolox correspondiente a la técnica ORAC.

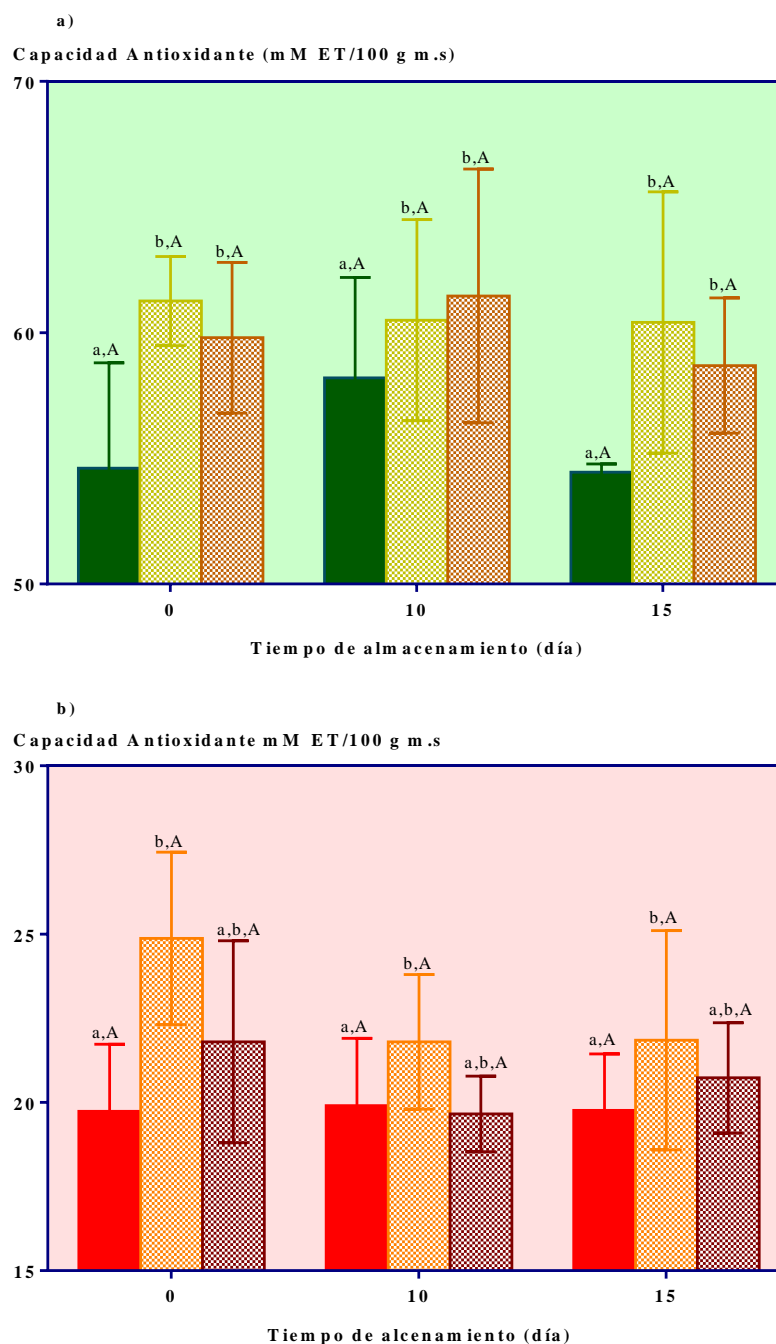


Figura 4-1-12. Valores promedio de la capacidad antioxidante por cada 100 g de masa seca (mM de equivalente trolox (ET)/100 g m.s.) analizadas por las técnicas: ABTS (a) y ORAC (b). Frutos frescos FF (●,●) y expuestos a distintas concentraciones de ozono: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●,●); 5,1 mg O₃.L⁻¹ 20 min (●,●). Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Se puede notar que la tendencia de los valores obtenidos es similar a la que se ha observado para el resto de compuestos estudiados en este punto: los valores correspondientes a los frutos tratados con 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 y 20 min fueron superiores en un 25 y 10 % a los obtenidos en los frutos frescos en el día 0, respectivamente. Estas diferencias fueron significativas respecto de los FF para arándanos ozonizados durante 10 min.

Durante el almacenamiento los valores de CA en los frutos control permanecieron prácticamente constantes; en cambio en las muestras ozonizadas sus valores disminuyeron ligeramente. Sin embargo dichas disminuciones no fueron significativas.

Correlación entre el contenido de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante

Se analizó la correlación entre cada uno de los compuestos bioactivos antes mencionados y la capacidad antioxidante utilizando todas las muestras de arándano y sus días de almacenamiento de forma conjunta. Se evaluaron los pares entre: a) antocianinas y contenido de fenoles; b) antocianinas y CA valorada por la metodología ABTS; c) antocianinas y CA valorada por la metodología ORAC; d) fenoles y CA valorada por la metodología ABTS; e) fenoles y CA valorada por la metodología ORAC; f) CA valorada por ABTS con CA valorada por ORAC.

La **Tabla 4-10** muestra los valores de significación y los coeficientes de correlación para cada uno de los pares ensayados. Se encontró correlación significativa entre el contenido de antocianinas con los fenoles totales y la CA medida por ambos métodos ($p < 0.0001$; $p = 0,007$; $p = 0,002$, respectivamente). Los valores de los coeficientes de correlación positiva obtenidos entre el contenido de antocianinas y fenoles mostraron una correlación moderada entre estos compuestos ($r = 0,65$), sugiriendo que el contenido de fenoles totales estuvo altamente influenciado por el contenido de antocianinas presentes en el arándano. Las correlaciones encontradas entre las antocianinas y CA (medida por ambos métodos) fueron menores. Así es posible inferir que las antocianinas contribuyen en gran parte a la CA pero a su vez está depende de otros compuestos con actividad antioxidante.

Con respecto al contenido de fenoles totales se observó una correlación positiva significativa con la CA medida por ABTS, pero no hubo correlación significativa con la capacidad antioxidante medida por ORAC ($p = 0,010$; $p = 0,065$ respectivamente). Esto podría estar indicando que la metodología de ABTS es más adecuada que la ORAC para determinar la CA dada por

compuestos fenólicos en el arándano. Sin embargo, como se mencionó anteriormente dicha actividad depende también de otros compuestos y por ello es necesario la aplicación de distintas metodologías que faciliten una apreciación global de la actividad antioxidante. No se observó correlación significativa entre las dos metodologías ensayadas para medir CA: ABTS y ORAC ($p = 0,254$).

Tabla 4-10. Coeficientes de significancia y correlación entre los valores de antocianinas, fenoles y capacidad antioxidante.

	Antocianinas	Fenoles	ABTS	ORAC
Antocianinas	1	0,000	0,007	0,002
Fenoles	0,650	1	0,010	0,065
ABTS	0,426	0,409	1	0,254
ORAC	0,472	0,298	0,187	1

Varias publicaciones han reportado que las plantas, frutos y vegetales activan mecanismos de defensa como respuesta al estrés biológico inducido por factores externo, como por ejemplo el ozono, irradiación y otros. (Benezer-Benezer y col., 2008; Glowacz y col., 2015). Sandermann y col. (1998) mencionó que, cuando los órganos de la planta son expuestos a condiciones de abióticas estresantes como el ozono, se desencadena la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO); como consecuencia de la acumulación de las ERO, los órganos de las plantas inducen la síntesis de fitoalexinas (isoflavonoides, estilbenos) y otros sistemas antioxidantes. Benezer-Benezer y col. (2008) clasifica dichos mecanismos o sistema de defensa como a) sistemas antioxidantes enzimáticos y b) no enzimáticos. Los sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen el ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides; en cambio los mecanismos enzimáticos se conforman por enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (AP), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT).

Respecto a ésta temática se han reportado varios resultados del efecto del ozono sobre productos frescos, los cuales según lo mencionado en bibliografía dependen de la matriz vegetal, la dosis de ozono aplicada y la fase de aplicación (gaseosa o acuosa).

Con respecto al tratamiento de frutas con **ozono en fase acuosa** y su efecto sobre los compuestos bioactivos existen pocos estudios y menos aún en frutos de arándano. Alexandre y col. (2012) reportaron un incremento en el contenido de antocianinas de frutillas tratadas con ozono en fase acuosa (0,3 ppm) y almacenadas durante 13 días a 4 °C. Dichos autores mencionaron que

después de 13 días de almacenamiento el incremento observado en las frutillas ozonizadas fue de un 82 % y 55 % respecto a la frutilla no tratada y el control (lavado con agua destilada), respectivamente. Silveira y col. (2018) encontraron que el contenido de fenoles totales y la CA fue significativamente superior en uvas (cvs. Thopsom Seedless y black Seedless) que fueron tratadas con agua ozonizada ($2 - 8 \text{ mg.L}^{-1} \text{ O}_3$) y almacenadas por 21 días (5°C). Además señalaron que, el incremento de fenoles totales y la CA resultaron dependientes de la dosis de ozono y variedad de uva. En frambuesas ozonizadas ($0,3$ y $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$) y almacenadas por 8 días (5°C) también se ha reportado un incremento en el contenido de fenoles totales y CA (Onopiuk y col., 2017).

Piechowiak y col. (2018) evaluaron el efecto del ozono en fase gaseosa sobre los compuestos bioactivos de los frutos de arándano. Dichos autores señalaron que el tratamiento con ozono en los frutos de arándano mantuvo altos niveles de la capacidad antioxidante y redujo las pérdidas de vitamina C, antocianinas y flavonoides. Dichos autores ozonizaron los frutos con ozono (15 ppm) por 28 días (4°C , 95 % HR) en intervalos de 30 min (12 h/día). El contenido de vitamina C incrementó significativamente en los frutos ozonizados durante los primeros 14 días de almacenamiento, mientras que en el control permaneció constante. Después de los 14 días este contenido disminuyó en ambos casos, sin embargo los frutos ozonizados siempre presentaron contenidos de vitamina C más elevados. El contenido de antocianinas y flavonoides no incremento en los frutos ozonizados, sus valores se mantuvieron constantes hasta el día 7 y luego dichos valores disminuyeron; por el contrario, los valores de antocianinas y flavonoides del control disminuyeron desde el inicio del almacenamiento. Así mismo, otros trabajos señalan que el ozono no afectó en el contenido de los compuestos antioxidantes presentes en algunos productos. Song y col. (2003) almacenaron frutos de arándano por 1, 2 y 4 días (10°C , 95 - 98 % HR) en atmósferas que contenían ozono gaseoso (200 y 700 ppb). Estos autores mencionaron que no hubo un incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de los frutos ozonizados respecto al control.

El incremento de los compuestos fenólicos en algunos frutos se ha asociado al incremento de la actividad de la fenilalanina amonío liasa (PAL, enzima reguladora en la biosíntesis de compuestos fenólicos.) o a una la reducción de actividad de alguna enzimas como polifenol oxidasa (PPO) y / o la peroxidasa (POD) (Booker y Miller, 1998; Pérez y col., 1999; Rodoni y col., 2010; Glowacz y col., 2015). En la presente investigación, el incremento de los compuestos bioactivos evaluados y la capacidad antioxidante observados podría estar asociado a una de las razones

mencionas. En futuros estudios sería importante evaluar la actividad de dichas enzimas con el fin de clarificar la posible respuesta hormética del ozono en frutos de arándano.

4.1.6 Aportes e integración de los resultados

Numerosos estudios han reportado el efecto del ozono en fase acuosa o gaseosa en la calidad poscosecha de diferentes frutas. Sin embargo, las publicaciones referidas a frutos de arándano son muy escasas.

El impacto del **ozono** (en fase gaseosa o acuosa) se ha evaluado en arándano en la microbiota nativa (mesófilos totales, hongos y levaduras), así como también en microorganismos superficialmente inoculados, tales como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *B. cinerea* (Song y col., 2003; Bialka y Demirci, 2007; Sharpe y col., 2009; Crowe y col., 2012; Pangloli y Hung, 2013; Concha-Meyer y col., 2015; Piechowiak y col., 2018).

En relación a la efectividad del ozono sobre *B. cinerea*, solo Sharpe y col. (2009) de los autores antes mencionados, investigaron sobre el tema. Dichos autores mencionaron que el ozono en fase gaseosa redujo significativamente la viabilidad de los conidios de *B. cinerea* (99,5%), como así también el crecimiento del micelio aéreo de este patógeno de la planta (menos de 1 mm) respecto al control (4,7 mm) después de haber sido expuesto a concentraciones de 450 o 600 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ozono durante 48 h a 20 °C. Así mismo, los autores señalaron que en frutos de arándano que fueron previamente rociados con una suspensión de 5×10^6 esporas/mL de *B. cinerea*, posteriormente tratados con 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ozono por 48 h a 20 °C y finalmente almacenados durante 12 días (20 °C, 95%), no se detectó una disminución significativa en la incidencia de *B. cinerea* respecto al control.

Algunos de los autores señalados anteriormente evaluaron, además del aspecto microbiológico, el efecto del ozono sobre la calidad y algunos compuestos bioactivos de interés en arándano. Bialka y Demirci (2007) mencionaron que los frutos tratados con ozono en fase acuosa no presentaron diferencias significativas en el color respecto al control. Concha-Meyer y col. (2015) evaluaron el efecto del ozono gaseoso (4 mg.L^{-1}) en arándanos que fueron tratados y posteriormente almacenados durante 10 días (4 °C). Estos autores no observaron diferencias significativas en la pérdida de peso y la firmeza de los frutos ozonizados respecto al control. Por

último, una publicación reciente de Piechowiak y col. (2018) señaló que el tratamiento con ozono en fase gaseosa (15 mg.L^{-1}) en frutos de arándano (almacenados 28 días, 4°C , 95 % HR), permitió mantener altos niveles de la capacidad antioxidante y redujo las pérdidas de vitamina C, antocianinas y flavonoides en comparación a los frutos no tratados.

Hasta nuestro conocimiento, en lo que respecta a los tratamientos con ozono en fase acuosa y su efecto sobre la microbiota nativa y particularmente *B. cinerea* en frutos de arándano no hay información reportada; como así tampoco sobre el impacto en las propiedades de calidad y compuestos bioactivos. En consecuencia, se resalta el **aporte** de este trabajo en cuanto al efecto inhibitorio del tratamiento en la microbiota nativa y *B. cinerea*, ya que se pudo comprobar que las dos concentraciones ensayadas a distintos tiempos de exposición disminuyeron significativamente el porcentaje de desarrollo fúngico respecto al control (FF).

Los resultados obtenidos en la presente tesis permitieron observar que ninguno de los tratamientos con ozono afectó significativamente el color, el pH, el contenido de acidez titulable, sólidos solubles y la humedad de los arándanos tratados; en cambio, sí provocó un incremento en la pérdida de peso de los frutos tratados, la cual fue dependiente de la concentración de ozono y el tiempo de exposición. Dicha pérdida podría deberse a la modificación en la composición química de las ceras epicuticulares debido al alto poder oxidante del ozono y a su redistribución; como también a los cambios observados en el epicarpo del tejido de arándano. Por tanto el PP (%) constituye uno de los parámetros a tomar en cuenta a la hora de seleccionar la dosis de ozono con que se descontaminarían los frutos de arándano; dicha dosis debe lograr una buena desinfección de los frutos y a su vez minimizar la pérdida de peso de los mismos.

Los parámetros mecánicos no revelaron cambios significativos en los frutos ozonizados. Si bien esta constancia de los parámetros mecánicos no correlacionó con los cambios microestructurales, esta aparente no concordancia se atribuyó en parte a la evaluación incompleta de la curva F vs D, como así mismo a la alta variabilidad en las propiedades mecánicas de la población de arándanos estudiada.

Se observó un incremento en todos los compuestos bioactivos ensayados y la capacidad antioxidante como consecuencia de los tratamientos de ozono aplicados. Sin embargo, entre las muestras ozonizadas no se observaron aumentos significativos en los valores de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante cuando los frutos de arándano fueron expuestos a ozono durante tiempos mayores a 10 min.

4.2 APLICACIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA

4.2.1 Selección de las dosis de radiación UV-C

El rango de la dosis de radiación UV-C utilizado en este trabajo fue seleccionado teniendo en cuenta el efecto en distintos microorganismos observados en estudios preliminares por integrantes del grupo: Gómez y col. (2010) y Schenk y col. (2007). Además se realizó una revisión de las dosis reportadas en bibliografía por distintos autores al evaluar el efecto de la luz UV-C en diferentes frutas enteras (Fava y col., 2006). Como se mencionó en el **ítem 3.4.3** los frutos se irradiaron durante 7, 11 y 15 min, correspondiendo estos tiempos a dosis de 5,3; 8,3 y 11,4 kJ/m², respectivamente.

4.2.2 Evaluación de la respuesta microbiológica

4.2.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa

La **Figura 4-2-1** muestra la evolución del porcentaje de frutos infectados, FI (%), para los frutos frescos (FF), los frutos control 0 kJ/m² y los frutos tratados a las distintas dosis de radiación UV-C ensayadas. Los frutos control 0 kJ/m² consistieron en arándanos que fueron agitados durante 15 min dentro de la cabina de luz UV-C en las mismas condiciones que los irradiados pero con las lámparas UV-C apagadas.

Al igual que en los frutos tratados con ozono, el crecimiento fúngico ocurrió principalmente en la zona de inserción del pedúnculo y mínimamente en la zona inferior del fruto. En todas las dosis ensayadas, el tratamiento con luz UV-C presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de mohos. En términos generales, después de 20 días de almacenamiento los frutos tratados con luz UV-C presentaron un 50 % menos de crecimiento fúngico, en comparación a los frutos frescos (FF) y los frutos control 0 kJ/m². Así mismo, el tratamiento con luz UV-C retrasó en al menos 4 (5,3 kJ/m²) y 6 (8,3 y 11,4 kJ/m²) días el desarrollo fúngico en los frutos tratados, respecto a los FF y al control 0 kJ/m².

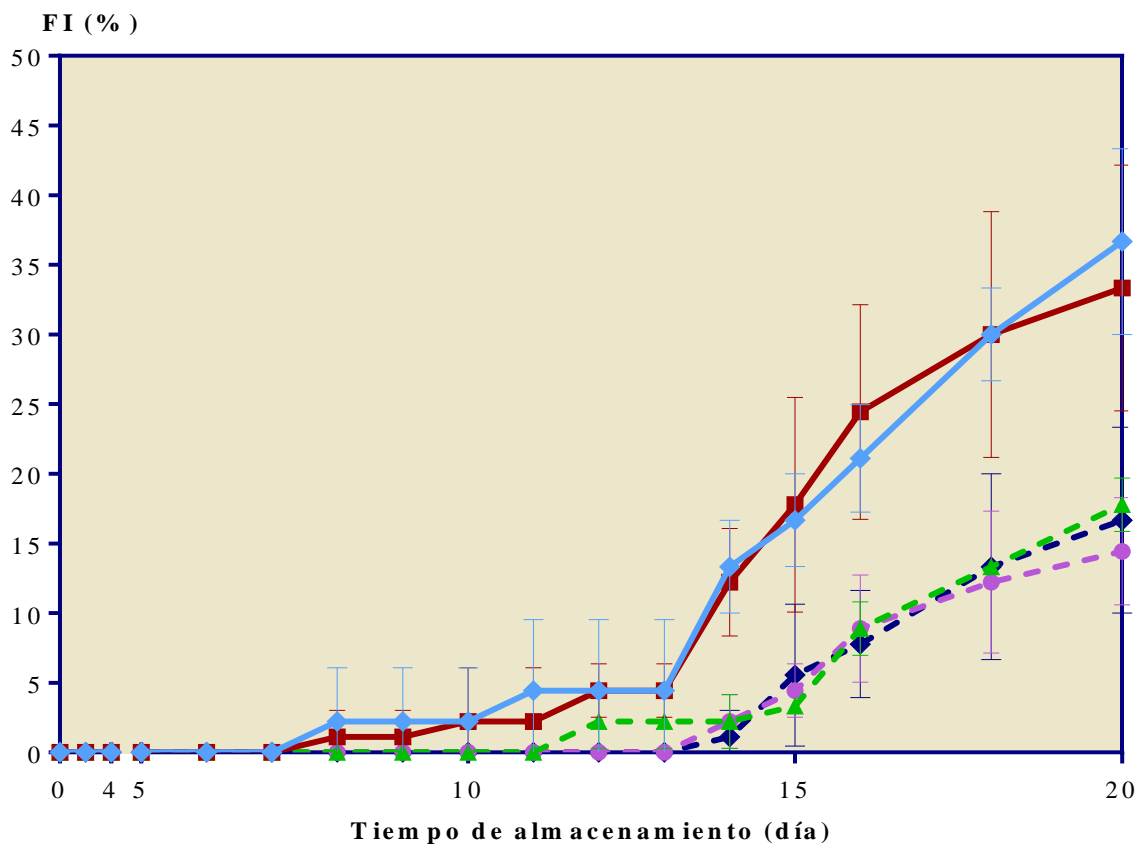


Figura 4-2-1. FI (%) de **micobiota nativa** de arándanos expuestos a distintas dosis de radiación UV-C y almacenados a 8 ± 1 °C durante 20 días. FF (♦); 0 kJ/m² (■); 5,34 kJ/m² (▲); 8,3 kJ/m² (●); 11,4 kJ/m² (◆). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

En la **Tabla 4-11** se detallan los valores de los porcentajes acumulados de frutos infectados durante los 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y los controles. Para cumplir con los supuestos de ANOVA (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas y covarianzas entre tratamientos) los datos fueron transformados a arcoseno ($\arcsin(\sqrt{p})$). El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{28, 80} = 0,85$; $p = 0,680$). Al contrastar las muestras tratadas con luz UV-C respecto a las muestras FF y control 0 kJ/m², se observó que el FI (%) en las muestras tratadas fue significativamente menor ($F_{4, 80} = 34,40$; $p < 0,0001$) para todas las dosis ensayadas (5,3; 8,3 y 11,4 kJ/m²). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el valor de FI (%) entre las distintas dosis de radiación UV-C.

Tabla 4-11. Valores medios del porcentaje de frutos infectados por micobiota nativa presente en frutos frescos, control 0 kJ/m² y tratados con distintas dosis de radiación UV-C (5,3; 8,3; 11,4 kJ/m²) y almacenados a 8 ± 1 °C durante 20 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)								Promedio Total		
	0	5	10	15		20					
FI (%) ± DE											
0 kJ/m²	ND	ND	2,2 ± 3,8	16,7 ± 3,3	36,7 ± 6,7	16 ± 13	a				
	ND	ND	2,2 ± 3,8	17,8 ± 7,7	33,3 ± 8,8	16 ± 13	a				
5,3 kJ/m²	ND	ND	0,0 ± 0,0	3,3 ± 0,0	17,8 ± 1,9	6 ± 6	b				
8,3 kJ/m²	ND	ND	0,0 ± 0,0	4,4 ± 1,9	14,4 ± 3,8	5 ± 6	b				
11,4 kJ/m²	ND	ND	0,0 ± 0,0	5,6 ± 5,1	16,7 ± 6,7	5 ± 7	b				
Promedio Total			1 ± 2	10 ± 8	24 ± 11						
			A	B	C						

ND: visualmente sin desarrollo.

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Después de 20 días de almacenamiento, el porcentaje de frutos infectados para los frutos irradiados estuvo en el rango 14 – 17 %, correspondiendo el límite inferior del rango a la dosis intermedia (8,3 kJ/m²), si bien las diferencias no fueron significativas.

Tampoco se presentaron diferencias significativas en el FI (%) de los controles evaluados: FF y control 0 kJ/m² (**Tabla 4-11**).

La evolución del FI (%) fue significativamente diferente para los distintos períodos de almacenamiento evaluados ($F_{4, 80} = 74,71$; $p < 0, 0001$). Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentaron los días de almacenamiento, siendo FF y el control 0 kJ/m² los que mayor porcentaje de frutos infectados presentaron durante todo el almacenamiento.

Es importante señalar que, a pesar que en la **Tabla 4-11** se presentan los resultados resumidos para el día 0, 5, 10, 15 y 20, la inspección visual fue realizada diariamente y el análisis estadístico fue realizado incluyendo todos los días donde se presentó crecimiento fúngico.

4.2.2.2 Desarrollo de *B. cinerea*.

La inoculación de los frutos de arándano con *B. cinerea* BAFC 3003 se realizó de acuerdo a lo descrito en el **ítem 3.7.2**.

La descontaminación de los frutos inoculados con *B. cinerea* se realizó con las mismas dosis de radiación de luz UV-C utilizadas para el estudio de la micoflora nativa (5,3; 8,3; 11,4 kJ/m²). Como se había mencionado anteriormente, debido al rápido crecimiento de *B. cinerea* en los frutos inoculados tratados y sin tratar, éstos fueron almacenados durante sólo 15 días. No se realizó un control de frutos inoculados y luego agitados durante 15 min con las lámparas UV-C apagadas debido a que, como se mencionó en el estudio de la micobiota nativa, la agitación no ejerció ningún efecto.

En la **Figura 4-2-2** se observa la evolución del FI (%) en el fruto fresco inoculado (FF_(B.c)) y en los arándanos expuestos a las distintas dosis de radiación UV-C ensayadas.

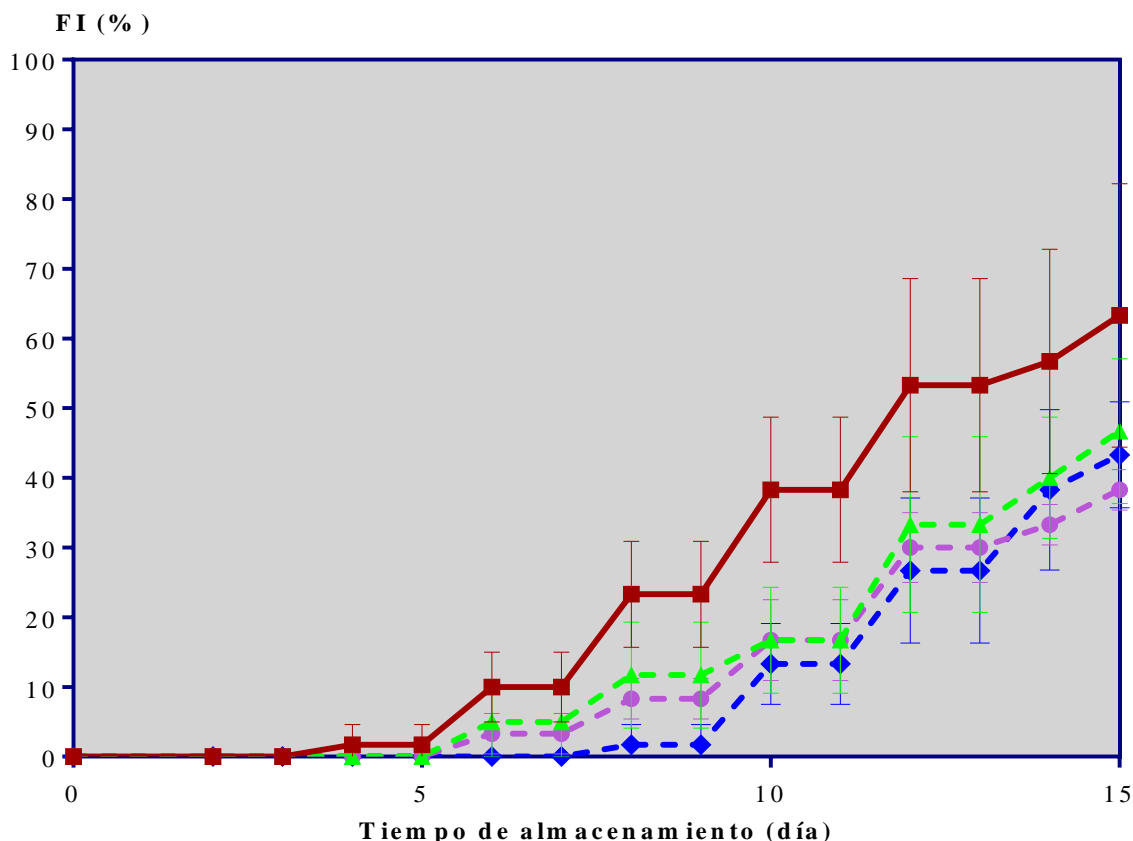


Figura 4-2-2. FI (%) de *B. cinerea* BAFC 3003 de arándanos expuestos a distintas dosis de radiación UV-C y almacenados a 8 °C durante 15 días. FF (B.C.) (■); 5,34 kJ/m² (▲); 8,3 kJ/m² (●); 11,4 kJ/m² (◆). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

Los frutos frescos inoculados presentaron infección con el moho en el cuarto día de almacenamiento, mientras que en los frutos irradiados con luz UV-C el crecimiento de *B. cinerea* se registró a partir de los días 6 (5,3; 8,3 kJ/m²) y 8 de almacenamiento (11,4 kJ/m²). Es decir, la luz UV-C en todos los casos ejerció un efecto inhibitorio en el moho, retrasando en al menos 2 días su aparición.

En la **Tabla 4-12** se detallan los valores de los FI (%) durante los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores para establecer diferencias significativas entre tratamientos. El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento ($F_{21, 64} = 1,24$; $p = 0,2519$). En todos los casos, el porcentaje de frutos infectados en las muestras tratadas con luz UV-C fue significativamente menor ($F_{3, 64} = 20,32$; $p < 0,0001$) respecto al control.

Tabla 4-12. Valores medios del porcentaje de frutos infectados con *B.cinerea* en frutos control y tratados con distintas dosis de radiación UV-C (5,3; 8,3; 11,4 kJ/m²) y almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)								Promedio Total					
	0	5		10		15								
	FI(%) ± DE													
FF _(B,c)	ND	1,7	±	2,9	38,3	±	10,4	63,3	±	18,9	41	±	29	a
5,3 kJ/m²	ND	0,0	±	0,0	16,7	±	7,6	46,7	±	10,4	28	±	22	b
8,3 kJ/m²	ND	0,0	±	0,0	16,7	±	5,8	38,3	±	2,9	24	±	18	b
11,4 kJ/m²	ND	0,0	±	0,0	13,3	±	5,8	43,3	±	7,6	26	±	23	b
Promedio Total		0,4	±	1,4	21	±	12	48	±	14				
		A			B			C						

ND: visualmente sin desarrollo

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Al igual que en los resultados obtenidos en el estudio de flora nativa, no se observaron diferencias significativas entre los FI (%) entre las distintas dosis de radiación UV-C ensayadas. La dosis que en promedio resultó en un menor porcentaje de frutos infectados fue 8,3 kJ/m².

Todos los períodos de tiempo de almacenamiento analizados (0, 5, 10, 15 días) fueron significativamente diferentes entre sí ($F_{7, 64} = 72,18$; $p < 0, 0001$); el porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentaron los días de almacenamiento.

La radiación UV-C ha sido utilizada históricamente para la desinfección de aguas y superficies, de instrumental de laboratorio e incluso de algunas áreas de trabajo de la industria alimentaria. Existen numerosas publicaciones respecto a su efectividad contra microorganismos patógenos y de deterioro, e incluso se destaca su efecto precursor de respuestas horméticas que pueden mejorar las características organolépticas de los frutos, como propiedades mecánicas y síntesis de compuestos de interés biológico (Perkins-Veazie y col., 2008; Charles y col., 2009; Wang y col., 2009). Sin embargo, el efecto de estas tecnologías sobre la flora nativa suele presentar diferencias con respecto a la respuesta de microorganismos patógenos y de deterioro en frutos artificialmente contaminados, estando dicha respuesta influenciada por condiciones ambientales y geográficas, cultivar y/o fecha de cosecha.

Se han realizado varios estudios sobre el efecto de la luz UV-C sobre la flora nativa y sobre microorganismos inoculados artificialmente en frutos de arándano. Xu y col. (2016) y Xu y Liu (2017) irradiaron frutos de arándano (cv. Berkeley) con luz UV-C y evaluaron su efecto sobre la flora nativa de los mismos. Los frutos fueron sometidos a dosis de 4 kJ/m² y almacenados a 4 ± 1 °C (lote 2016 y 2017). Después de 8 días de almacenamiento observaron que los frutos de arándano irradiados presentaron un FI (%) significativamente menor (15 y 28 %, respectivamente) respecto a los frutos no tratados (22 y 32 %, respectivamente). Perkins-Veazie y col. (2008) evaluaron también la eficacia de la luz UV-C (0 - 4 kJ/m²) sobre la flora nativa en arándanos (cvs. Collins, Bluecrop) que fueron irradiados y almacenados durante 7 días a 5 °C; posteriormente a este primer almacenamiento, los frutos fueron almacenados durante 2 días más a 20 °C para simular condiciones de comercialización. Al igual que lo antes mencionado, estos autores observaron un porcentaje menor en el crecimiento de la flora nativa (10 %) respecto a los controles. Similares resultados observaron Nguyen y col. (2014) en arándanos (cv. Duke) irradiados con luz UV-C (6 kJ/m²) y almacenados durante 28 días (0 °C, 95 % HR). Al final del almacenamiento (28 días)

dichos autores observaron en los frutos control un 7,2 % más de frutos infectados, comparado a los frutos irradiados.

Por otra parte, diversos estudios en frutas (tomate, mango, ananá, tomate cherry, uva, frutilla y otros) que fueron previamente inoculados con microorganismos patógenos, patógenos de la planta y microorganismos de deterioro, tales como *B. cynerea*, *Botryosphaeria dothidea*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157:H7, señalaron que el tratamiento con luz UV-C fue efectivo para contrarrestar la pudrición causada por estos microorganismos (Nigro y col., 1998; Charles y col., 2009; Pombo y col., 2009; Song y col., 2011; Janisiewicz y col., 2015; Pinheiro y col., 2015; Terao y col., 2015; Sari y col., 2016). Moreno y col. (2017) evaluaron el efecto de la luz UV-C (6, 10 y 15 kJm⁻²) sobre la flora nativa (bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras) de rodajas de carambola (almacenadas a 4 °C , 21 días). Inmediatamente después del tratamiento, estos autores observaron reducciones de 2,5 y 1,9 log CFU/g en las bacterias mesófilas y en mohos y levaduras, respectivamente. Mencionaron que a pesar que durante el almacenamiento se incrementaron los recuentos de los microorganismos, después de 7 y 14 días las rodajas irradiadas mostraron valores más bajos que el control.

4.2.3. Estudio de la estructura

4.2.3.1 Observación de la microestructura

Tejido de arándano fresco y control 0 kJ/m²

En la **Lámina 4-2-I A, B** se observa el corte transversal del tejido de **frutos frescos** (FF). Las características estructurales observadas fueron similares a las del control descrito en el **ítem 4.1.3.1**. La epidermis fue uniestratificada con células de sección cuadrangular a rectangular (células epidérmicas), citoplasma parietal con vacuola central turgente, repleta de contenidos.

Al igual que lo descrito para la FF correspondiente al lote de los frutos ozonizados, las paredes tangenciales externa (PTE) e interna (PTI) fueron más gruesas que las paredes radiales (PR). La PTE se coloreó intensamente con azul de toluidina. En posición subsuperficial se observaron 2-3 capas de células subepidérmicas, rectangulares a isodiamétricas. (**Lámina 4-2-I A**).

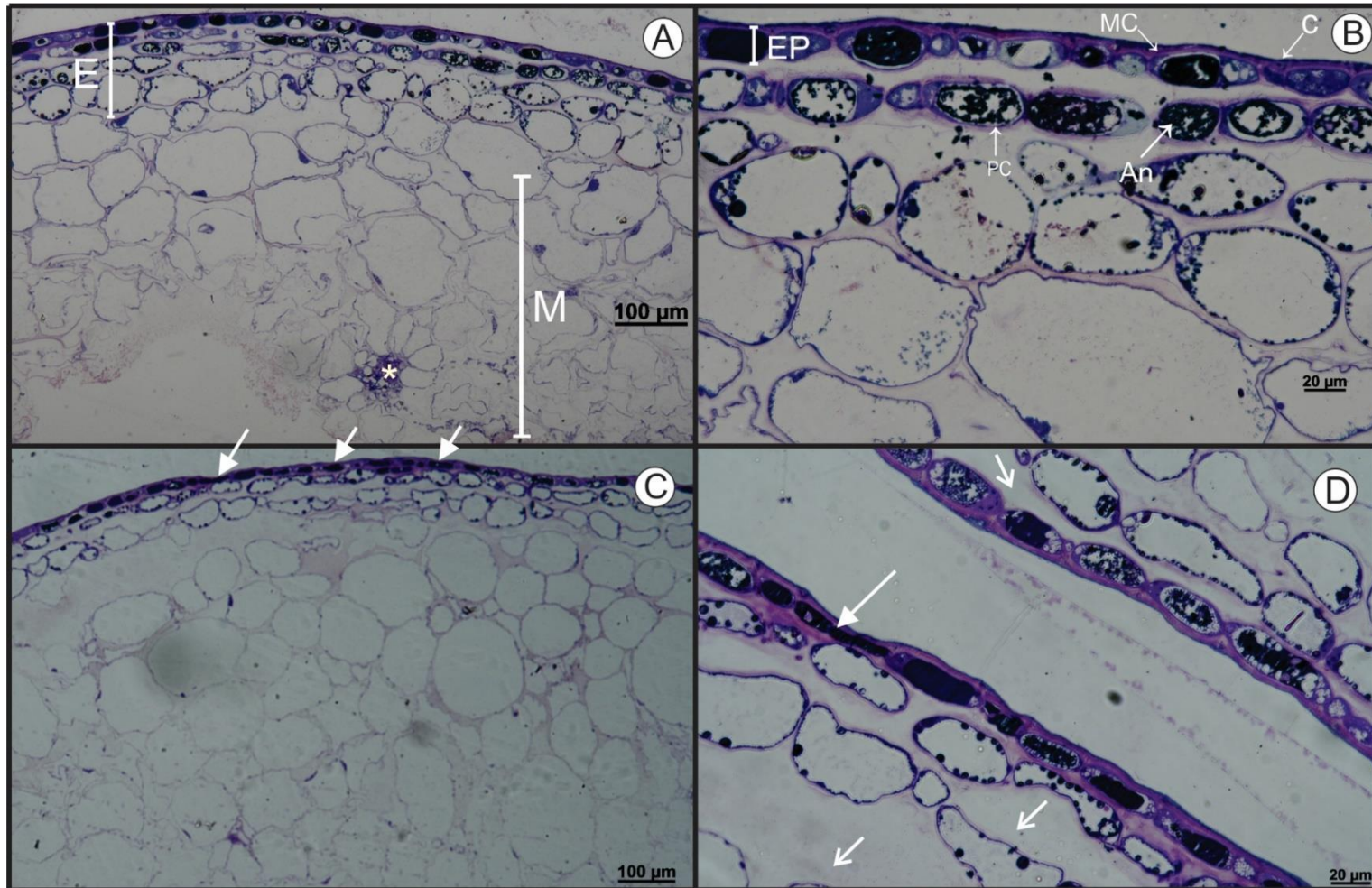


Lámina 4-2-I. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco y control 0 kJ/m². **A-D:** aspecto general de un corte transversal. **A, B:** FF. **C, D:** control 0 kJ/m². Epidermis, EP; epicarpo, E; mesocarpo, M; pared celular, PC; membrana cuticular, MC; cutícula, c; antocianinas, An; espacios intercelulares, →; haces vasculares, *; compactación tangencial, ➔.

En el mesocarpo, formado por células de tamaño diverso y forma redondeada a más irregular, podían distinguirse haces vasculares y espacios celulares de tamaño variable.

Como se menciona en materiales y métodos, para una irradiación uniforme de la superficie de los frutos, fue necesario agitarlos durante el tratamiento. El control 0 kJ/m² (frutos agitados durante 15 minutos con lámparas UV-C apagadas), fue también observado en MO para determinar si la agitación provocaba algún daño microestructural en el fruto independientemente de la irradiación. En **Lámina 4-2-I C, D** se observan las imágenes correspondientes. El tejido de los frutos control 0 kJ/m² se observó similar al de los FF; solamente pudo visualizarse una ligera compactación tangencial en algunas zonas del epicarpo (especialmente las células epidérmicas) debido a la agitación de los frutos. Las células epidérmicas en las que hubo compactación tangencial se observaron rectangulares, radialmente comprimidas con citoplasma parietal y vacuola central repleta de contenidos. Por otra parte el mesocarpo fue similar al descrito para los FF.

Las alteraciones provocadas por la agitación fueron menores en las muestras control del tratamiento con luz UV-C (agitadas por 15 min en el agitador rotacional) que en las muestras control del tratamiento con ozono (agitadas con O₂ durante 10 - 30 min en la columna de burbujeo). Las muestras control 0 kJ/m² presentaron compactación solo en algunas zonas del epicarpo, se observaron menos disrupciones en las células epidérmicas y no hubo grandes incrementos en el espacio intracelular entre las células epidérmicas y las subepidérmicas.

Tejido de arándano irradiado con luz UV-C

Las fotomicrografías de los frutos irradiados con 5,34 y 11,4 kJ/m² de luz UV-C mostraron características estructurales similares independientemente de la dosis (**Lámina 4-2-II**). Al igual que el control 0 kJ/m², el corte transversal del tejido mostró compactación tangencial del epicarpo solo en algunas zonas.

Algunas células epidérmicas se observaron rectangulares y radialmente comprimidas, mientras que otras conservaron la forma similar de las de los FF. La compactación no afectó al epicarpo completo y las células epidérmicas y subepidérmicas se vieron turgentes con citoplasma parietal y vacuola central, numerosas vesículas con contenido y paredes celulares nítidas.

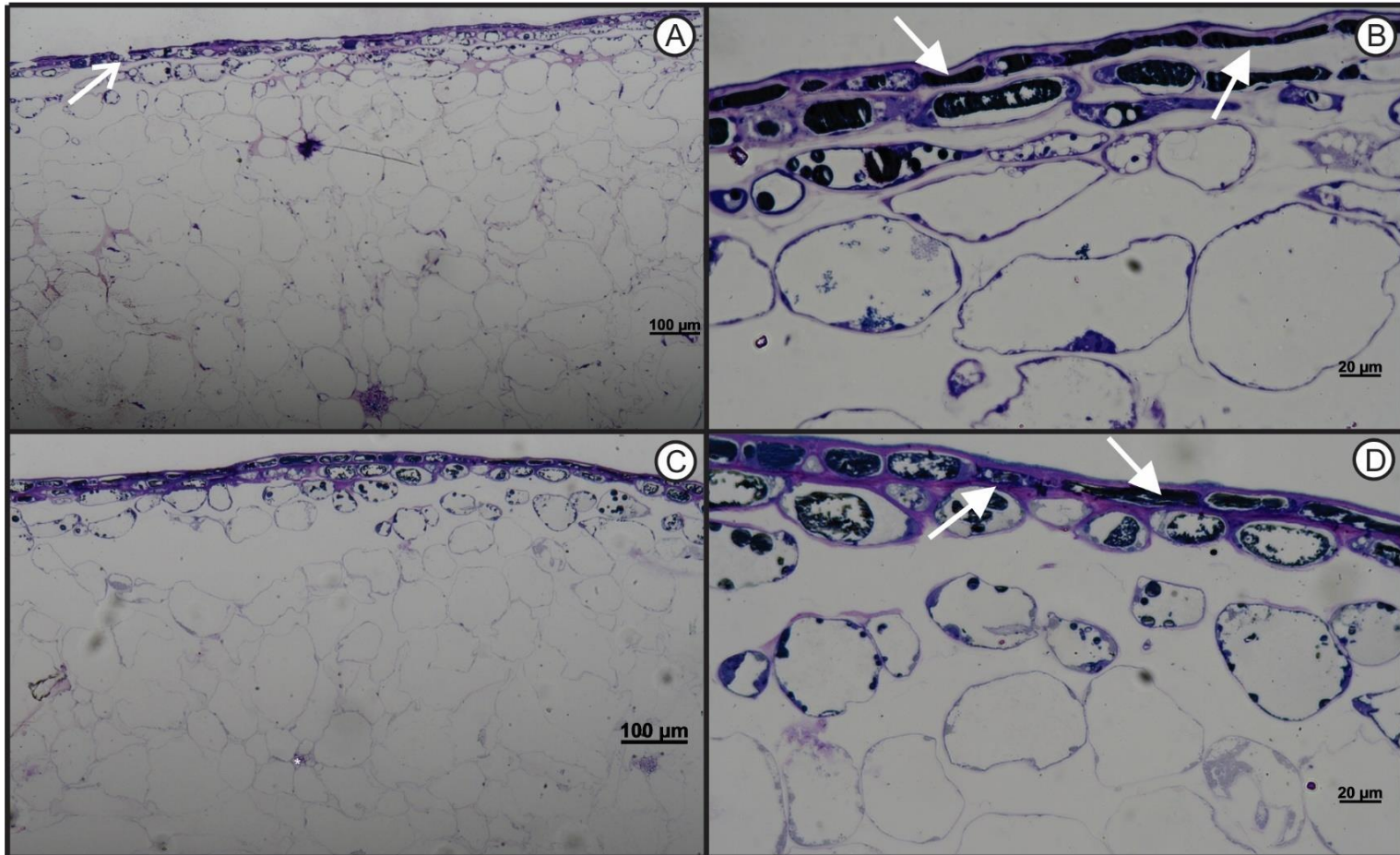


Lámina 4-2-II. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano irradiados con luz UV-C. **A-D:** aspecto general de un corte transversal. **A, B:** 5,34 kJ/m². **C, D:** 11,4 kJ/m². Disrupciones, →; compactación tangencial, ➔.

En el mesocarpo se observaron células con contorno irregular (ondulado a anguloso), repletas de contenido y haces vasculares. Ocasionalmente, la irradiación provocó una disminución de la tinción o directamente algunas microrupturas en la MC, las se extendían hasta las células epidérmicas (**Lámina 4-2-II A**).

Tejido de arándanos frescos y tratados con luz UV-C y almacenados en refrigeración

Luego de **10 días** de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, el tejido de los frutos frescos almacenados no se vio mayormente afectado respecto de los frutos frescos del día 0. Se observó células epidérmicas cuadrangulares a rectangulares más grandes, con numerosas vacuolas y citoplasma denso entre estas. La PTE se coloreó intensamente con azul de toluidina: la cutícula (c) se tiñó de azul intenso con cuñas a nivel de las paredes radiales de las células epidérmicas, la capa cutinizada (cc) tomó coloración púrpura. La capa péptica y la PC se pudieron distinguir claramente por su color púrpura y azul intenso, respectivamente. Las capas subepidérmicas (2) al igual que el resto de tejido, incluido el mesocarpo, se observaron sin alteraciones mayores (**Lámina 4-2-III A**).

Los frutos irradiados presentaron el epicarpo similar al del día 0; se observó una leve contracción tangencial y en muy escasas zonas disrupción de la PTE; la capa cutinizada se observó uniforme en toda la sección del tejido evaluada. La coloración de la cutícula y la capa cutinizada fue levemente menos intensa a la de los FF. Las células epidérmicas se mostraron cuadrangulares a rectangulares, con citoplasma y numerosas vesículas traslúcidas y vacuolas repletas de contenidos. Los espacios intercelulares (EI) de las muestras irradiadas con 5,34 kJ/m² fueron similares al de los FF (**Lámina 4-2-III C**), mientras que los frutos irradiados con 11,4 kJ/m² mostraron EI ligeramente más grandes (**Lámina 4-2-III E**).

Una característica distintiva inducida por el almacenamiento refrigerado, tanto en los FF como en los arándanos irradiados, fue el reforzamiento de las paredes del epicarpo, puesto de manifiesto por la coloración oscura de la PTE y principalmente, de la PTI, que se observó con una alta densidad de tinción hasta la primer capa de células subepidérmicas.

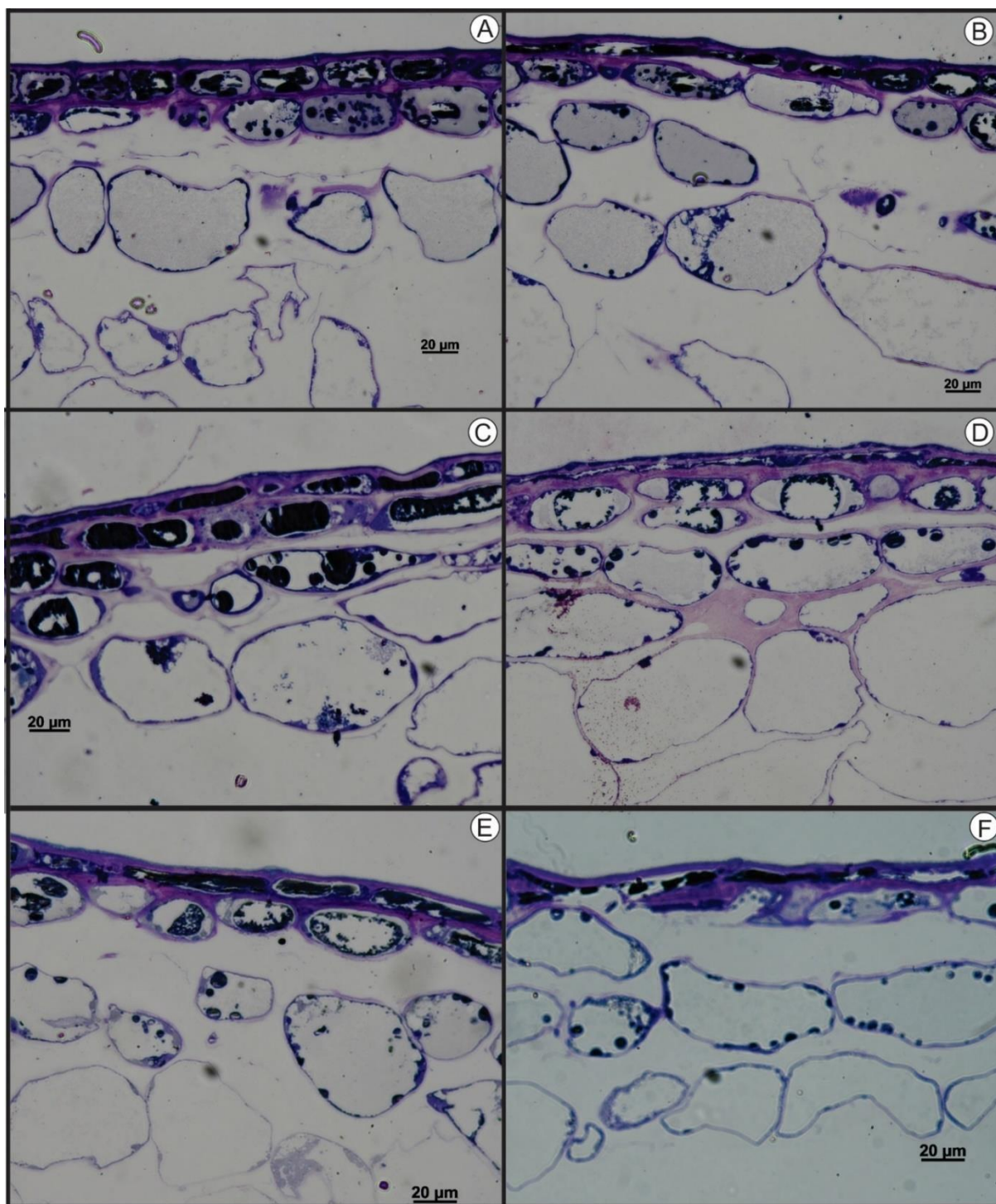


Lámina 4-2-III. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco e irradiados con luz UV-C, almacenados durante 10 días (A, C, E) y 15 días (B, D, F) a 8 ± 1 °C. A, B: FF. C, D: 5,34 kJ/m². E, F: 11,4 kJ/m².

Después de **15 días** de almacenamiento, el tejido de las muestras FF se observó degradado. Se evidenció compactación tanto del epicarpo como del mesocarpo. Las células epidérmicas se mostraron contraídas tangencialmente y en algunos casos con signos de plasmólisis. Se observaron amplios EI entre células epidérmicas y subepidérmicas; sin embargo estas células en su mayoría se observaron repletas de contenido y con un citoplasma conservado (**Lámina 4-2-III B**).

Las muestras irradiadas y almacenadas durante 15 días presentaron similitud con el tejido de los FF para el mismo día de almacenamiento. Los frutos irradiados con ambas dosis mostraron células epidérmicas ligeramente más compactadas tangencialmente que las muestras FF. Además se observó algunas disrupciones en la PTE y las células epidérmicas. Para ambas dosis se evidenciaron ligeros signos de laxitud tanto en el epicarpo como en el mesocarpo. La tinción de la cutícula, capa cutinizada y PC fue más tenue que en el control almacenado, indicando que el tratamiento y almacenamiento prolongado de las muestras afecta visiblemente el epicarpo (**Lámina 4-2-III D-F**).

En líneas generales se puede mencionar que el tratamiento con luz UV-C causó algunos cambios microestructurales, sobre todo a nivel del epicarpo, que fueron más leves que los inducidos por el tratamiento de ozonización.

4.2.3.2 Observación de la ultraestructura

Superficie de arándano fresco y control 0 kJ/m²

La **Lámina 4-2-IV A, B** corresponde a la observación de FF y ya ha sido descrita en el ítem **4.1.3.2**. La superficie se mostró heterogénea, reticulada, con surcos o grietas entre las ceras epicuticulares distribuidas sobre la superficie del fruto y vislumbrándose debajo el contorno poligonal de las células epidérmicas. La fotomicrografía de los frutos control 0 kJ/m² mostró un aspecto general similar al de los FF (**Lámina 4-2-IV C**). Sin embargo, el detalle de las ceras epicuticulares (**Lámina 4-2-IV D**) indicó en ciertas zonas una redistribución de las ceras, que tendieron a unirse formando agregados mayores, dejando menos distancia entre placas y por tanto surcos más angostos. Esta redistribución es justificable debido a que, al agitarse los frutos en el agitador orbital, fueron rozándose entre sí y a su vez con la plataforma del agitador, provocando que la cera se esparciera sobre la superficie del fruto.

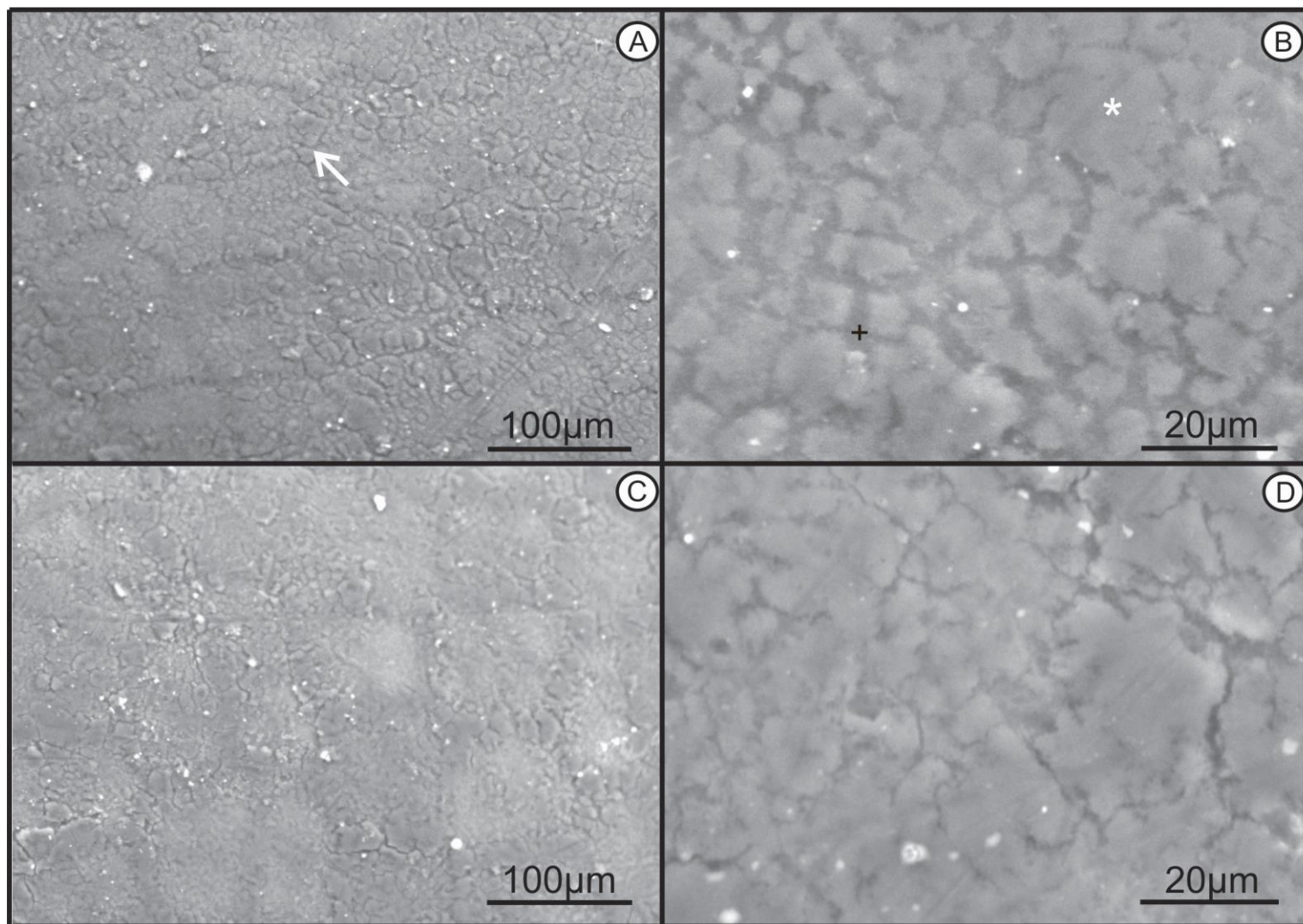


Lámina 4-2-IV. Fotomicrografías con MEBA de frutos de arándano fresco y control 0 kJ/m² en vista superficial. **A, B:** FF. **C, D:** control 0 kJ/m². **A, C:** aspecto general de la superficie del arándano; **B, D:** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. (*) ceras en forma de placas, (+) surcos entre ceras epicuticulares, (→) contorno poligonal de las células epidérmicas.

Superficie de arándanos irradiados con luz UV-C

En general, la superficie de los frutos irradiados en el día 0 se mostró similar, independientemente de la dosis. El patrón de distribución de las ceras epicuticulares en los frutos irradiados mostró aleatoriamente placas de tamaño similar a las de los FF y placas algo más grandes, en general con menos surcos y menos distancia entre cristal y cristal debido al crecimiento de los mismos (**Lámina 4-2-V B-D**). En vista superficial se distinguió el contorno poligonal de las células epidérmicas (**Lámina 4-2-V A-C**).

Superficie de arándanos fresco, control e irradiados y almacenados en refrigeración

Los FF almacenados presentaron una capa de ceras ligeramente alterada con respecto al día 0. En vista superficial, en el **día 10** de almacenamiento, las muestras FF presentaron una leve separación de las ceras, evidenciándose zonas laxas que dieron el aspecto de una capa delgada o menos espesa (**Lámina 4-2-VI A, B**). Durante el **día 15** de almacenamiento este comportamiento se acentuó, llegando a observarse algo más del epicarpo de los frutos debido a la separación un poco más pronunciada de las ceras y la escasez de las mismas (**Lámina 4-2-VII A, B**).

En los frutos control e irradiados con ambas dosis de radiación UV-C y almacenados durante 10 días (**Lámina 4-2-VI C, D** y **Lámina 4-2-VI E-H**, respectivamente) se observó en vista superficial una distribución de las ceras con un patrón similar al día 0: las ceras tendieron a agregarse en comparación a los FF, con la diferencia que los surcos entre las ceras aparecían menos profundos y la capa pareció ser más delgada, con placas más transparentes que al día 0. Luego de alcanzar los 15 días de almacenamiento, la muestra control 0 kJ/m^2 (**Lámina 4-2-VII C, D**) mostró un patrón bastante similar al del día 10. En las muestras irradiadas, las ceras se mostraron muy aglutinadas, más amorfas, con un aspecto muy diferente al día 0, especialmente las que fueron irradiadas con una dosis de $11,4 \text{ kJ/m}^2$ (**Lámina 4-2-VII E-F**).

Debe destacarse que las alteraciones detectadas en la distribución de ceras podrían en parte ser atribuida al desprendimiento mecánico de las mismas durante la agitación de los frutos en el tratamiento con luz UV-C. Sin embargo, en vista superficial se pudieron detectar algunas diferencias entre las muestras control 0 kJ/m^2 e irradiadas, que indicarían un efecto específico de la luz UV-C en las ceras.

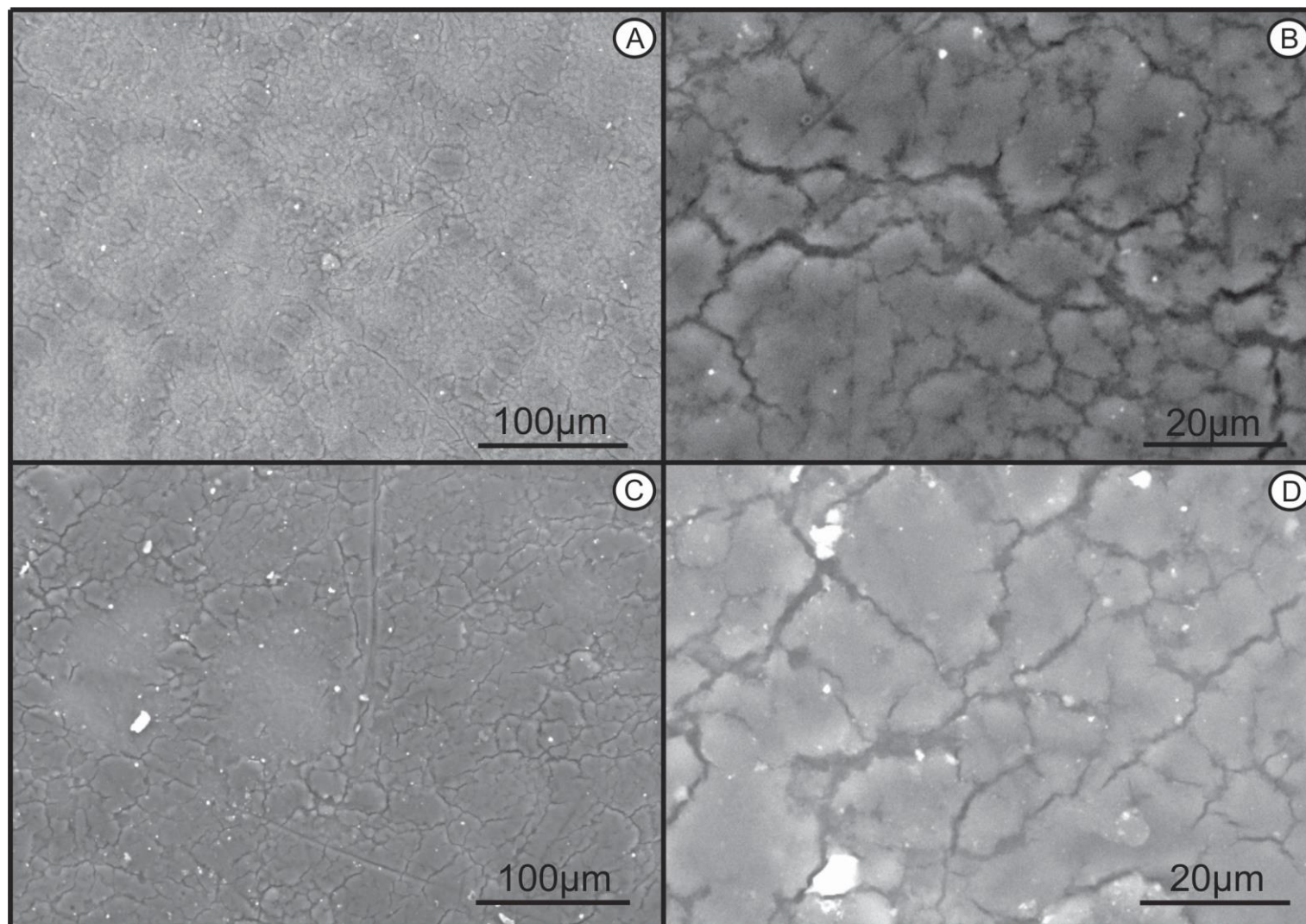


Lámina 4-2-V. Fotomicrografías con MEBA de frutos de arándano irradiados con luz UV-C. **A, B:** 5,34 kJ/m². **C, D:** 11,4 kJ/m². **A, C:** aspecto general de la superficie del fruto; **B, D:** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial.

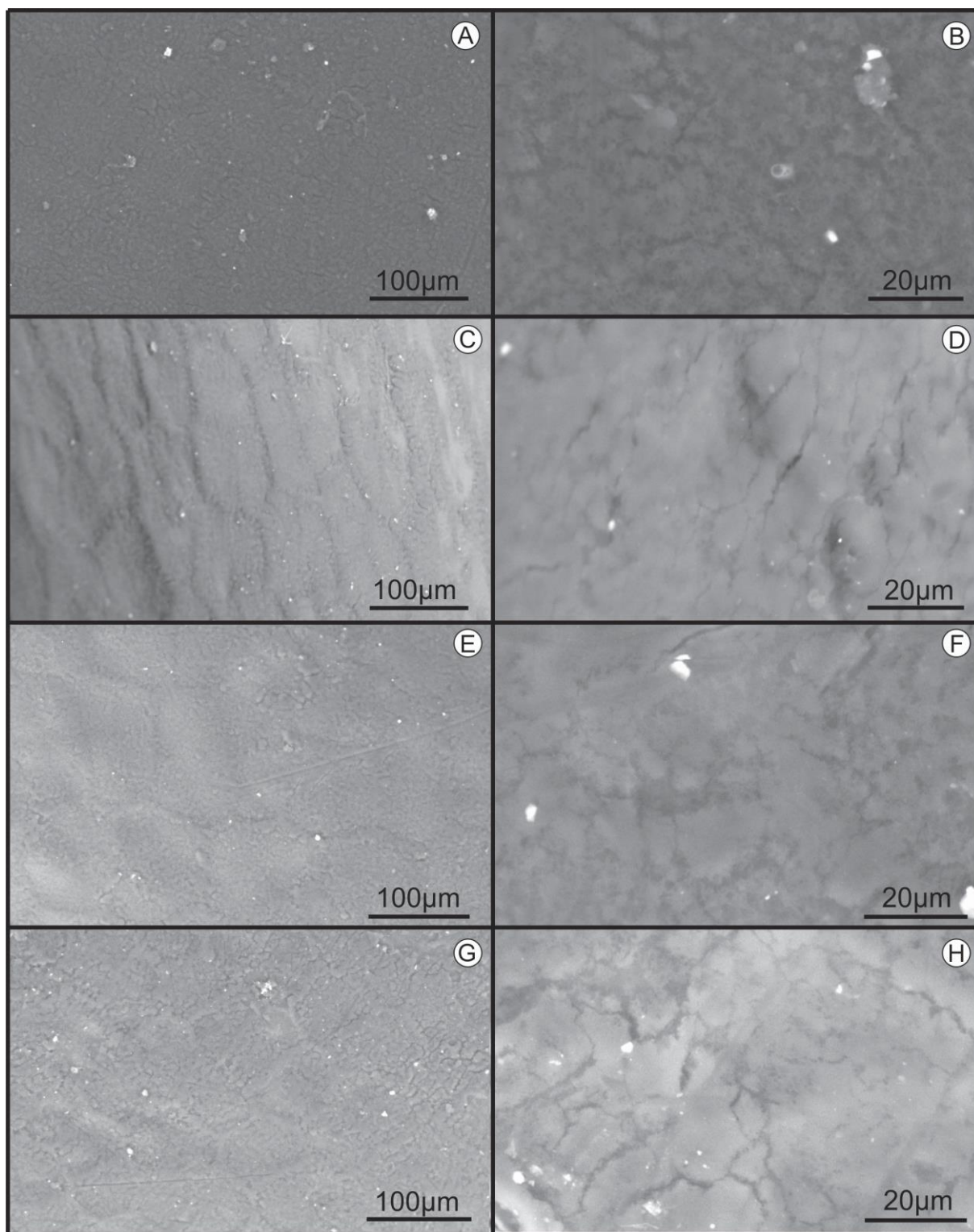


Lámina 4-2-VI. Fotomicrografías con MEBA de frutos de arándano fresco, control 0 kJ/m² e irradiados con luz UV-C, almacenados durante 10 días a 8 ± 1 °C. **A, B:** FF. **C, D:** control 0 kJ/m². **E, F:** 5,34 kJ/m². **G, H:** 11,4 kJ/m². **A, C, E, G:** aspecto general de la superficie; **B, D, F, H:** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial.

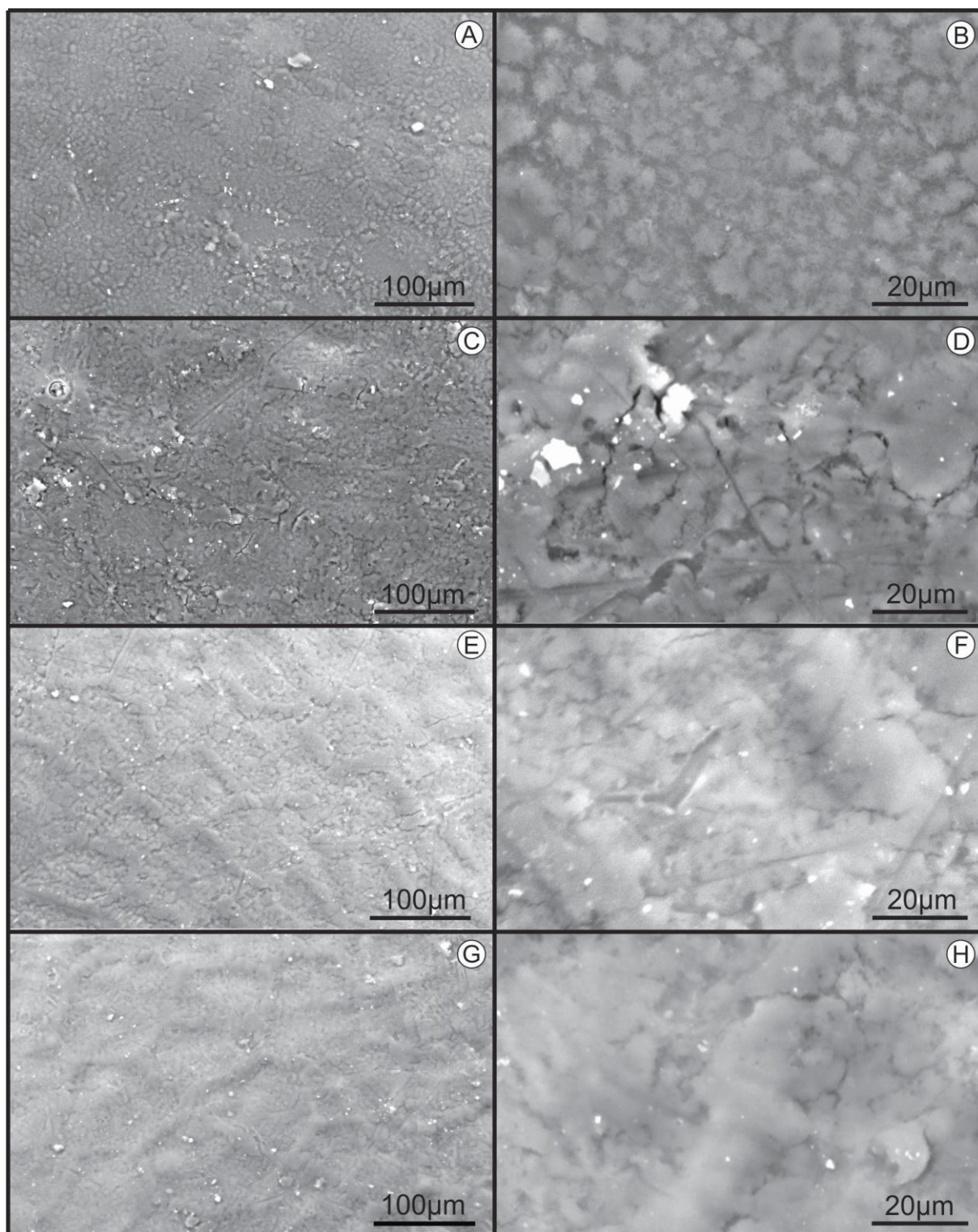


Lámina 4-2-VII. Fotomicrografías con MEBA de frutos de arándano fresco, control 0 kJ/m² e irradiados con luz UV-C, almacenados durante 15 días a 8 ± 1 °C. **A, B:** FF. **C, D:** control 0 kJ/m². **E, F:** 5,34 kJ/m². **G, H:** 11,4 kJ/m². **A, C, E, G:** aspecto general de la superficie; **B, D, F, H:** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial.

4.2.4 Evaluación de parámetros de calidad

Al igual que en lo descrito en el **ítem 4.1.3**, para la selección de tratamientos en los que posteriormente se evaluarían los parámetros de calidad (propiedades mecánicas, pérdida de peso y color), caracterización físico-química y compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante) de las muestras se analizaron los resultados de los estudios de la respuesta de la microbiota nativa y de *B. cinerea*. Dado que no se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis de radiación UV-C ensayadas, se decidió evaluar el efecto de la dosis más baja (5,3 kJ/m²) y la más alta (11,4 kJ/m²) sobre los parámetros antes mencionados.

4.2.4.1 pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad.

Las determinaciones de pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad fueron realizadas de acuerdo a lo establecido en el **ítem 3.8.1**. En la **Tabla 4-13** se detallan los resultados obtenidos para las muestras control y las irradiadas durante 7 y 15 min con luz UV-C, correspondiente a las dosis de 5,3 y 11,4 kJ/m², respectivamente.

Para cada uno de los parámetros evaluados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y control. El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” en ninguna de estas determinaciones ($F_{4, 18} = 1,43$; $p = 0,2634$; $F_{4, 18} = 0,70$; $p = 0,6040$; $F_{4, 18} = 0,21$; $p = 0,9282$; $F_{4, 18} = 0,77$; $p = 0,5586$, para pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles y humedad respectivamente).

No se observaron diferencias significativas ($F_{2, 18} = 0,83$; $p=0,45$) en los valores de **pH** de las muestras tratadas con luz UV-C respecto a los FF. Durante el almacenamiento, los valores de pH fueron incrementándose leve pero significativamente ($F_{2, 18} = 41,64$; $p < 0,001$), siendo mayor el valor de pH en las muestras (FF y tratadas) almacenadas durante 15 días.

Con respecto a la **acidez titulable** (% p/p de ácido cítrico), no se encontró interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “día de almacenamiento” ($F_{2, 18} = 0,70$; $p = 0,60$). Los valores de acidez titulable en las muestras irradiadas no presentaron diferencias significativas con respecto los FF ($F_{2, 18} = 0,48$; $p = 0,6242$).

Tabla 4-13. Valores promedio de pH, acidez titulable (Acidez, % p/p de ácido cítrico), sólidos solubles (SS), humedad (M) y sus correspondientes desviaciones estándar de los frutos de arándano fresco y tratados con luz UV-C a diferentes dosis.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	pH		Acidez (%)		SS (°Brix)		M (g H ₂ O/g m.s)	
0	FF	3,4 ± 0,12	a, A	0,43 ± 0,02	a, A	12,1 ± 0,5	a, A	5,5 ± 0,1	a, A
	5,3 kJ/m ²	3,3 ± 0,04	a, A	0,45 ± 0,09	a, A	12,0 ± 0,5	a, A	5,4 ± 0,1	a, A
	11,4 kJ/m ²	3,3 ± 0,08	a, A	0,43 ± 0,01	a, A	12,1 ± 0,6	a, A	5,5 ± 0,2	a, A
10	FF	3,5 ± 0,10	a, B	0,36 ± 0,07	a, B	12,9 ± 0,7	a, A	5,0 ± 0,1	a, B
	5,3 kJ/m ²	3,5 ± 0,09	a, B	0,34 ± 0,06	a, B	12,6 ± 0,5	a, A	5,0 ± 0,1	a, B
	11,4 kJ/m ²	3,5 ± 0,03	a, B	0,31 ± 0,04	a, B	12,5 ± 0,6	a, A	5,1 ± 0,4	a, B
15	FF	3,7 ± 0,05	a, C	0,31 ± 0,05	a, B	12,6 ± 0,4	a, A	5,1 ± 0,1	a, B
	5,3 kJ/m ²	3,7 ± 0,05	a, C	0,29 ± 0,03	a, B	12,8 ± 0,6	a, A	4,8 ± 0,5	a, B
	11,4 kJ/m ²	3,7 ± 0,03	a, C	0,31 ± 0,05	a, B	12,5 ± 0,5	a, A	5,2 ± 0,0	a, B

Los resultados fueron expresados como el promedio ± la desviación estándar de la muestra.

Los valores promedios de una misma columna identificados con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Los valores de acidez titulable variaron durante el almacenamiento. Al día 10 se observó una disminución significativa ($F_{2, 18} = 15,66$; $p < 0,001$) en los valores de acidez titulable tanto en las muestras FF como en las muestras tratadas con luz UV-C a las diferentes dosis de exposición, permaneciendo dichos valores prácticamente invariables hasta el día 15.

No se observaron diferencias significativas ($F_{2, 18} = 0,15$; $p = 0,8624$) en el contenido de **sólidos solubles** (° Brix) de las muestras irradiadas con luz UV-C y las muestras FF. Tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de SS durante el almacenamiento ($F_{2, 18} = 3,52$; $p < 0,0511$).

Al igual que en el resto de los parámetros fisicoquímicos evaluados, no se observaron diferencias significativas en el contenido de **humedad** (M, g H₂O/g m.s) entre los FF y las muestras tratadas ($F_{2, 18} = 1,19$; $p = 0,3282$). En todas las muestras evaluadas se observó una disminución leve pero significativa ($F_{2, 18} = 8,78$; $p < 0,0022$) en el contenido de humedad después de 10 días de almacenamiento, permaneciendo dichos valores prácticamente invariables hasta el final de este ensayo (15 días de almacenamiento).

4.2.4.2 Propiedades mecánicas

Como se mencionó anteriormente en el **ítem 4.1.3.2**, las curvas se registraron desde el instante en que la punta de acero tocó el epicarpo del fruto hasta que atravesó todo el mesocarpo del mismo. Las curvas (F vs D) del ensayo de penetración presentaron un pico de fractura bien definido, seguido de una caída abrupta de la fuerza inmediatamente después de la ruptura del epicarpo. Mientras la punta atravesó el mesocarpo del fruto, la fuerza permaneció aproximadamente constante (**Figura 4-2-3**).

En la **Tabla 4-14** se muestran los valores medios de los parámetros mecánicos fuerza máxima de ruptura (F_R), desplazamiento correspondiente a la F_R (D_R), trabajo (W) necesario para romper el epicarpo y la rigidez (R_i) obtenidos para las muestras FF, control 0 kJ/m² e irradiadas con luz UV-C a 5,3 y 11,4 kJ/m².

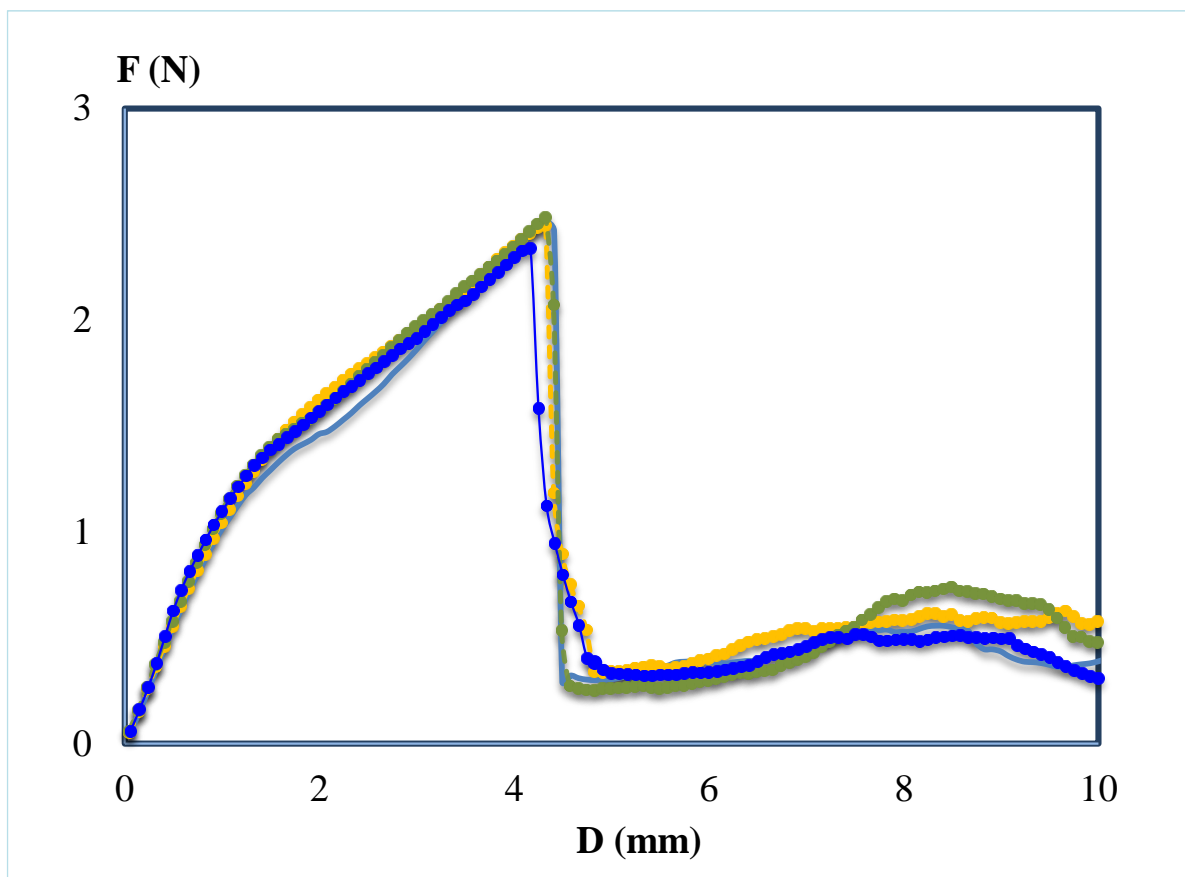


Figura 4-2-3. Curvas Fuerza vs. Desplazamiento típicas de arándanos frescos FF (●) y expuestos a distintas dosis de radiación UV-C: 0 kJ/m² (●); 5,34 kJ/m² (●); 11,4 kJ/m² (●).

El comportamiento de los parámetros mecánicos estudiados (F_R , D_R , W y R_i) fue similar entre las muestras tratadas y control para un mismo día de almacenamiento, a excepción del día 15. Durante el almacenamiento dichos parámetros fueron variando: en general la fuerza máxima de ruptura (F_R) y el desplazamiento (D_R) se incrementaron y como consecuencia también el trabajo (W); en el día 15, todos estos parámetros mostraron mayores valores que al día 0. La rigidez (R_i), por el contrario, fue disminuyendo y al día 15 se observó un pronunciado descenso en sus valores.

Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza multivariado (MANOVA). Previo a este análisis se evaluó el grado de asociación entre las variables estudiadas con un análisis de correlación. El trabajo (W) presentó correlación significativa ($p < 0,001$) con F_R y D_R ; por tanto esta variable fue excluida del análisis multivariado (F_R : $r = 0,87$; $r = 0,69$ y D_R : $r = 0,87$; $r = 0,67$; coeficiente de asociación lineal de Pearson y coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, respectivamente, en cada caso).

Tabla 4-14. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de F_R , D_R , W y R_i de los frutos de arándano fresco y tratados con luz UV-C a distintas dosis: 0; 5,34; 11,4 kJ/m² y almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	F_R (N)	D_R (mm)	W (mJ)	R_i (N/mm)	
0	FF	2,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,7	6,0 \pm 1,4	0,93 \pm 0,3	a
	0 kJ/m ²	2,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,9	5,9 \pm 2,0	0,94 \pm 0,3	a
	5,3 kJ/m ²	2,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,6	6,0 \pm 1,5	0,90 \pm 0,2	a,b
	11,4 kJ/m ²	2,3 \pm 0,4	4,3 \pm 0,6	5,9 \pm 1,6	0,85 \pm 0,2	a
5	FF	2,4 \pm 0,6	4,4 \pm 0,9	5,7 \pm 1,8	0,80 \pm 0,4	a,b,f,g
	0 kJ/m ²	2,6 \pm 0,5	4,5 \pm 0,7	6,4 \pm 1,7	0,82 \pm 0,3	a,b,d,f,g
	5,3 kJ/m ²	2,8 \pm 0,5	4,8 \pm 0,7	7,3 \pm 1,8	0,82 \pm 0,3	d,e,f,g
	11,4 kJ/m ²	2,7 \pm 0,6	4,8 \pm 0,7	7,3 \pm 2,1	0,83 \pm 0,2	a,b,d,e,f,g
10	FF	2,8 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	6,8 \pm 1,4	0,87 \pm 0,2	b, e,f
	0 kJ/m ²	3,0 \pm 0,6	4,8 \pm 0,6	7,7 \pm 1,6	0,87 \pm 0,2	d,e,f,g
	5,3 kJ/m ²	2,8 \pm 0,6	4,9 \pm 0,8	7,5 \pm 2,0	0,78 \pm 0,3	c,d,e,f,g
	11,4 kJ/m ²	3,0 \pm 0,6	5,2 \pm 0,9	8,6 \pm 2,2	0,85 \pm 0,3	d,e
15	FF	2,4 \pm 0,5	4,9 \pm 1,1	6,5 \pm 2,0	0,66 \pm 0,2	g
	0 kJ/m ²	2,6 \pm 0,7	5,5 \pm 1,0	7,6 \pm 2,5	0,61 \pm 0,2	e
	5,3 kJ/m ²	3,2 \pm 0,5	5,5 \pm 0,9	8,7 \pm 1,9	0,66 \pm 0,2	h
	11,4 kJ/m ²	3,2 \pm 0,7	5,4 \pm 1,0	8,6 \pm 2,4	0,69 \pm 0,2	h

Los resultados fueron expresados como el promedio (n=30) \pm la desviación estándar de la muestra. Los valores promedio de una misma fila identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

El análisis estadístico señaló interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{9, 465} = 5,12$; $p < 0,0001$). En la **Tabla 4-14** se puede observar que, para un mismo día de almacenamiento, el comportamiento de los frutos de arándano fue similar independientemente del tratamiento aplicado (FF, control 0 kJ/m² o irradiados), excepto en el día 15 donde las muestras irradiadas fueron significativamente diferentes a las muestras FF y control. En este último día de almacenamiento las muestras irradiadas mostraron un incremento significativo en los valores de F_R , respecto a los valores de FF y frutos control 0 kJ/m². Similar comportamiento se observó para D_R , excepto que éste incremento se observó también en los frutos control.

Al comparar los distintos días de almacenamiento, se observó que en el día 5, en general, los valores de las propiedades mecánicas (F_R , D_R , W y R_i) de los frutos irradiados con luz UV-C, control 0 kJ/m² y FF fueron iguales respecto al día 0 (excepto los frutos tratados con 5,3 kJ/m²); se observó solamente mínimas diferencias en los valores de R_i , los cuales fueron ligeramente más bajos. A los días 5 y 10 de almacenamiento no se observó mayores diferencias en las muestras evaluadas. Sin embargo, al comparar los días 0 y 10 se observó que las muestras fueron significativamente diferentes: los valores de F_R , D_R y W aumentaron en el día 10, mientras que R_i disminuyó ligeramente. El día 15 de almacenamiento fue significativamente distinto al resto de días evaluados: los valores de F_R , D_R y W se incrementaron aún más y R_i mostró una disminución en sus valores. El incremento de los valores de F_R en las muestras tratadas durante el día 15 de almacenamiento podría indicar una respuesta hormética del fruto a la irradiación, como se discutirá más adelante.

Se realizó un análisis de función discriminante (AFD), a partir del cual se obtuvo 3 funciones discriminantes (o ejes canónicos). En las **Tablas 4-15** y **4-16** se reportan los valores de los autovalores de la matriz grupos y las funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común.

La primera función discriminante resultante del AFD explicó el 83,50 % de la variabilidad de los datos, mientras que la segunda función discriminante explicó el 10,43 %. Ambas funciones explicaron el 93,90 % acumulado de la variabilidad total entre todos los tratamientos (**Tabla 4-15**). En la **Tabla 4-16** puede observarse que las variables R_i y F_R en la primera función discriminante presentaron el mayor valor absoluto respectivamente y por lo tanto fueron las variables que mayor

poder tuvieron para discriminar entre los tratamientos. En cambio F_R y D_R fueron las variables con mayor aporte en la segunda función discriminante.

Tabla 4-15 y 4-16. Autovalores y funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común correspondientes al análisis AFD de los estimadores de los parámetros obtenidos de la curvas de fuerza-desplazamiento de arándanos FF, 0 kJ/m² e irradiados con luz UV- C a 5,34 y 11,4 kJ/m².

Tabla 4-15

Autovalores			
Función discriminante	Valor	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	0,74	83,5	83,5
2	0,09	10,43	93,9
3	0,05	6,06	100

Tabla 4-16

Funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común			
	1	2	3
F_R	-2,31	1,57	-0,95
D_R	0,24	-1,12	1,60
R_i	4,2	-0,38	5,52

En la **Figura 4-2-4** se representa la clasificación de los tratamientos entre la primera y segunda función discriminante. Debido a que las muestras (independientemente del tratamiento) se distribuyeron como una gran nube de puntos, se graficaron solamente los centroides correspondientes a cada uno de los tratamientos para visualizar mejor los resultados obtenidos en el AFD.

El AFD no clasificó correctamente la mayoría de tratamientos debido a la similitud entre ellos, solamente un 19% del total de todas las muestras ($n = 480$) fueron clasificados correctamente en sus respectivos grupos. Los tratamientos mejor clasificados fueron los correspondientes a las muestras irradiadas con las diferentes dosis de radiación UV-C correspondientes al día 15 de almacenamiento ($\sim 45\%$). En concordancia con el MANOVA, en la **Figura 4-2-4**, se puede observar que los centroides correspondientes a los FF, control 0 kJ/m² e irradiados no se agruparon por tratamiento pero sí por tiempo de almacenamiento. Las muestras correspondientes al día 0 se agruparon más hacia el eje positivo de la función discriminante 1, separándose del siguiente grupo que se encuentra alrededor de los valores de 0 de la misma función y que corresponde a las muestras almacenadas durante los días 5 y 10. Este agrupamiento se explicaría principalmente por la variable R_i , cuyos valores en el día 0 son ligeramente superiores a los de los días 5 y 10.

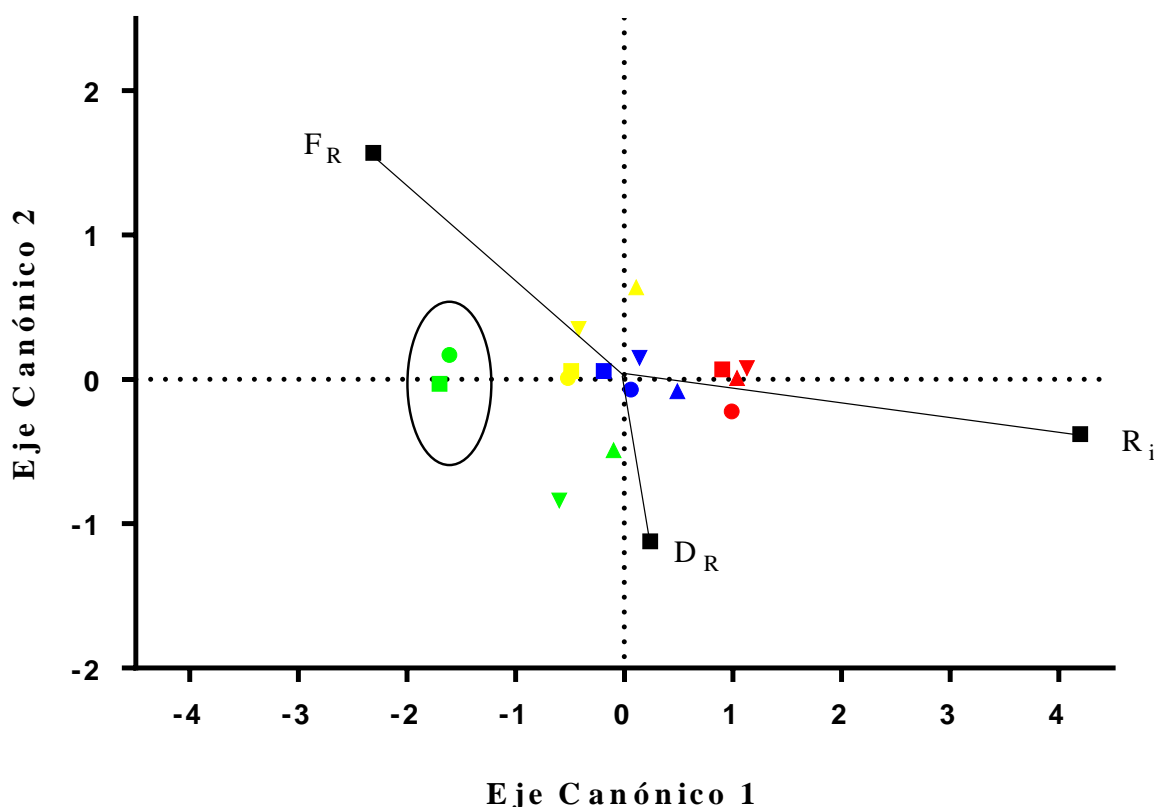


Figura 4-2-4. Centroides del análisis discriminante correspondiente a los estimadores de los parámetros mecánicos obtenidos a partir de los ensayos de punción de arándanos frescos FF (▲), control 0 kJ/m² (▼) y expuestos a distintas dosis de radiación UV-C: 5,3 kJ/m² (■) y 11,4 kJ/m² (●). Almacenados durante 0 (—), 5 (—), 10 (—) y 15 (—) días.

Las muestras correspondientes al día 15 se encontraron más hacia el eje negativo de la función discriminante 1 debido a los bajos valores de R_i . Sin embargo las muestras correspondientes a este día no se agruparon, sino que las muestras irradiadas se separaron de los FF y el control 0 kJ/m² debido a la diferencia en los valores de F_R .

Con el objetivo de evaluar de una manera cualitativa el comportamiento reológico de la región correspondiente al desplazamiento de la sonda después de la ruptura de la epidermis (subepidermis y el mesocarpo) de los frutos, se graficó las curvas F vs D de arándanos frescos, control e irradiados con luz UV-C. La **Figura 4-2-5**, muestra, a modo de ejemplo, solamente 10 de 30 curvas de cada condición. Las curvas observadas en ésta figura se corresponden con los resultados observados en la microestructura de los arándanos (día 0, ítem 4.2.3). Tanto la agitación como la irradiación provocaron solamente ligeras alteraciones en la PTE de los frutos de arándano.

Las disrupciones observadas en la PTE y en las paredes celulares de la epidermis fueron escasas y solamente en algunas zonas. Asimismo, los espacios intercelulares entre la células epidérmicas y subepidérmicas fueron mucho menores que los inducidos por los tratamientos de ozono. Por tanto, era de esperarse que los valores de fuerza necesarios para penetrar la subepidermis y el mesocarpo del arándano de los frutos agitados e irradiados resultasen similares a los observados en los FF.

Existen numerosos estudios en los que se atribuye un efecto favorable de la luz UV-C en el retraso de la maduración y la senescencia de frutas y hortalizas. Se ha señalado que la exposición de los tejidos a bajas dosis de radiación UV-C pueden inducir a la producción de poliamidas (inhibición de la degradación de la pared celular), inhibir la producción de etileno (retardo de la maduración), así como reducir la actividad de enzimas (poligalacturonasa, pectin metilesterasa, celulasa) de degradación de la pared celular (Maharaj y col., 1999; Barka y col., 2000; Rivera-Pastrana y col., 2007; Tiecher y col., 2013).

Dependiendo de la matriz evaluada e inclusive para una misma matriz, se han reportado diversos resultados respecto del efecto de la luz UV-C. Nguyen y col. (2014) y Xu y col. (2016) evaluaron el efecto de la luz UV-C en la firmeza del arándano. Los frutos fueron irradiados con dosis de 0 - 4 kJ/m² de luz UV-C y almacenados durante 28 y 8 días a temperaturas de 0 y 4 °C, respectivamente. Dichos autores observaron un retraso en la pérdida de firmeza de los frutos irradiados respecto al control. Perkins-Veazie y col. (2008) observaron un comportamiento similar en la firmeza de frutos de arándanos irradiados con luz UV-C (1 - 4 kJ/m²).

Xu y Liu (2017), por el contrario, no observaron grandes efectos en la firmeza de frutos de arándano almacenados durante 8 días a 4 °C luego de haber sido irradiados con dosis de 0 - 4 kJ/m².

Barka y col. (2000), Pinheiro y col. (2015) y Maharaj y col. (1999) señalaron un incremento en los valores de firmeza de los frutos de tomate irradiados respecto al control. En otros productos como pimienta, frutilla, naranjilla y hongos shiitake se ha demostrado también efectos positivos de la irradiación UV-C en la firmeza; los resultados fueron atribuidos a la reducción de la degradación enzimática de la pared celular (Vicente y col., 2005; Pombo y col., 2009; Jiang y col., 2010; Andrade-Cuvi y col., 2017). Por el contrario, Tiecher y col. (2013) observaron que los frutos de tomate irradiados con luz UV-C (3,7 kJ/m²) perdieron firmeza (o se ablandaron) casi de igual forma que los frutos control. Así mismo Khademi y col. (2013) no observaron efectos importantes en la firmeza de los frutos de caqui irradiados con 1,5 y 3 kJm⁻² de luz UV-C.

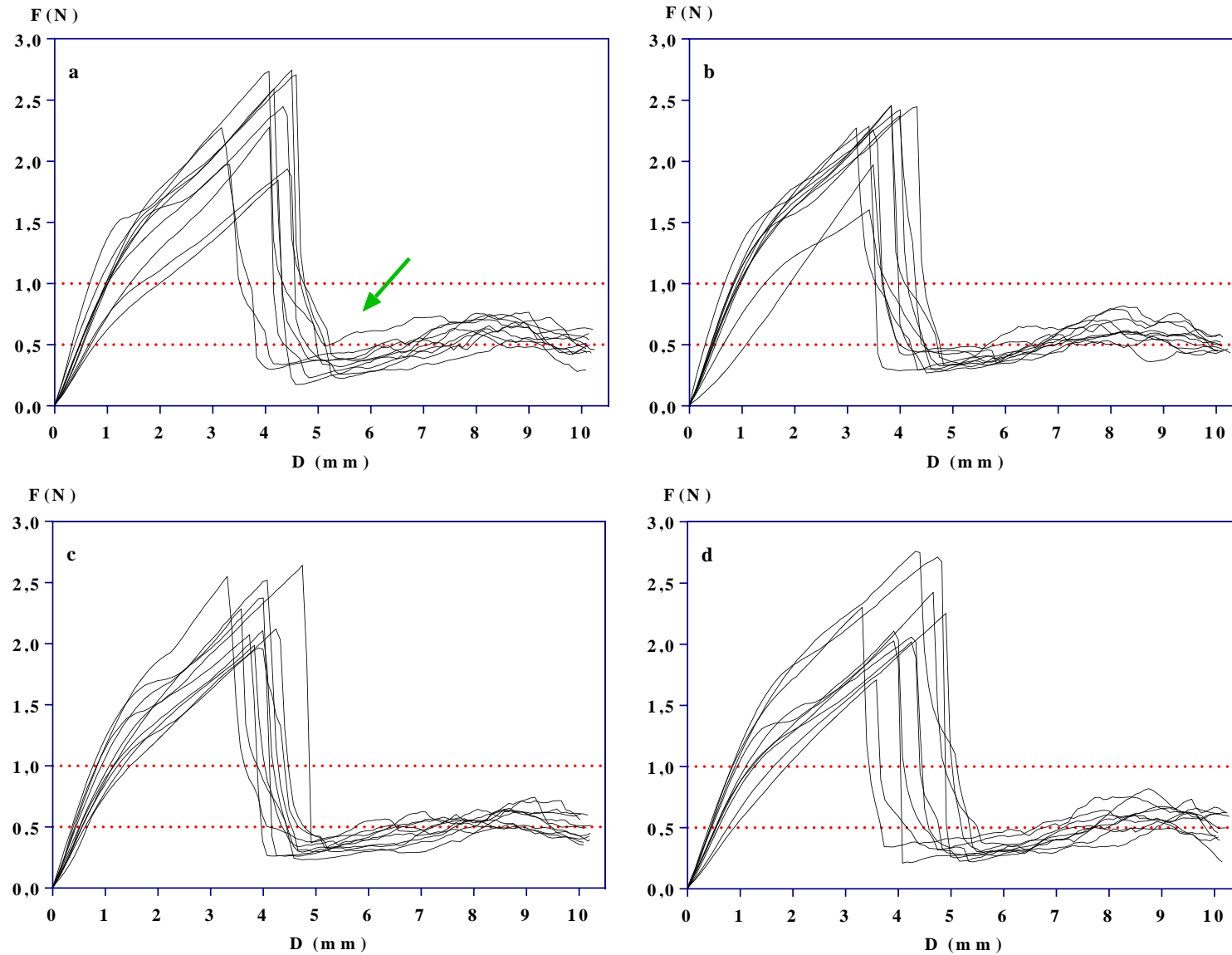


Figura 4-2-5. Curvas Fuerza vs. Desplazamiento típicas de arándanos frescos (FF) e irradiadas con luz UV-C correspondientes al día 0 de almacenamiento: (a) FF; (b) 0 kJ/m², frutos irradiados; (c) 5,3 kJ/m²; (d) 11,4 kJ/m². → Fuerza necesarios para penetrar la subepidermis y la pulpa del arándano (mesocarpo).

4.2.4.3 Pérdida de peso

En la **Figura 4-2-6** se muestran los porcentajes de pérdida de peso [PP (%)] de las muestras FF, control 0 kJ/m² e irradiadas con luz UV-C a lo largo del almacenamiento. Se observó una disminución de peso en todas las muestras evaluadas y además el PP (%) de todas las muestras se incrementó durante el almacenamiento.

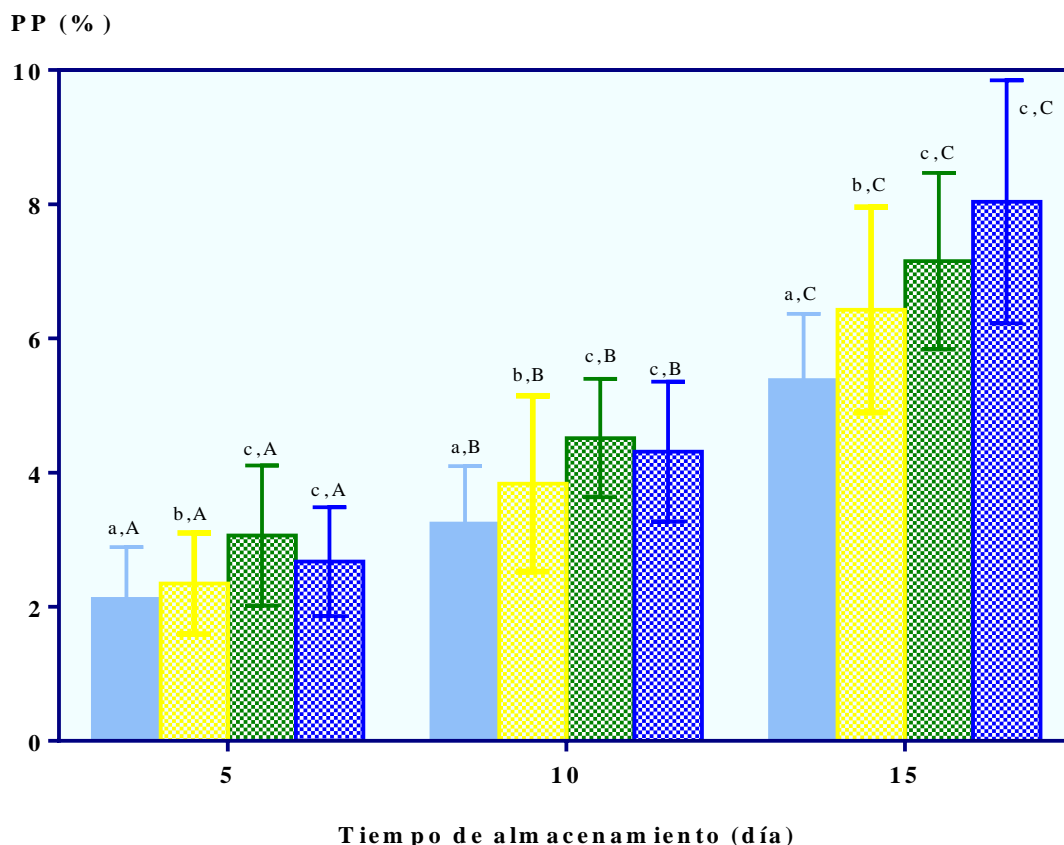


Figura 4-2-6. Valores promedio del PP (%) de arándanos frescos (■), 0 kJ/m² (■) y expuestos a distintas dosis UV-C: 5,34 kJ/m² (■); 11,4 kJ/m² (■). Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

El análisis estadístico realizado por GLMMs no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{6, 192} = 2,01$; $p = 0,0639$). Al contrastar los promedios de las muestras evaluadas para un mismo día, el PP (%) de las muestras irradiadas con luz UV-C fueron significativamente diferentes a las muestras FF y control 0 kJ/m² ($F_{3, 192} = 27,04$; $p < 0,0001$), mientras que entre muestras irradiadas no se observó diferencias significativas. Al

comparar los 2 controles, el análisis estadístico señaló diferencias significativas en el PP (%) de los FF respecto a los control 0 kJ/m².

Así mismo, el PP (%) de las muestras FF, las control 0 kJ/m² y la de los arándanos tratados con las distintas dosis de radiación UV-C se incrementaron significativamente ($F_{2, 192} = 368,00$; $p < 0,0001$) conforme aumentó el tiempo de almacenamiento en refrigeración a 8 ± 1 °C. Después de 15 días de almacenamiento el PP (%) para los frutos FF, control 0 kJ/m² e irradiados con 5,34 y 11,4 kJ/m² fue de 5,38; 6,43; 7,15 y 8,04 %, respectivamente.

La diferencias observadas en el PP (%) de los frutos FF y los frutos control e irradiados podrían deberse parcialmente a la remoción mecánica de las ceras epicuticulares que se produjo en los frutos al momento de su agitación. Los frutos control 0 kJ/m², aún sin haber sido irradiados, presentaron PP (%) significativamente más altos que los FF. Sin embargo, el tratamiento con luz UV-C en los frutos de arándano influyó también, ya que los frutos irradiados presentaron pérdidas de peso superiores a los frutos FF y control 0 kJ/m². Una posible causa podría ser, que al elevarse la temperatura (30 ± 1 °C al final del tratamiento) de la superficie de los frutos de arándano como producto de la irradiación, las ceras de estas bayas se desprenderían con mayor facilidad y en mayor cantidad que los frutos solo agitados. La remoción de las mismas producirá pérdidas excesivas de agua en los frutos y como consecuencia un aumento de la pérdida de peso de los mismos. Debe además considerarse que una mayor temperatura incrementa la transferencia de masa (agua) a través del tejido. Adicionalmente la observación microscópica mostró algunas disrupciones en la epidermis la cual aumentaría la pérdida de agua.

Si se compara el PP (%) de las muestras ozonizadas respecto a las irradiadas, en general, se observa que el PP (%) de las muestras irradiadas fue superior al de las muestras ozonizadas. Estos resultados podrían deberse, además de los distintos efectos que el ozono y la luz UV-C tendrían en la composición y distribución de ceras, a dos razones: a) la temperatura de almacenamiento: los frutos ozonizados e irradiados fueron almacenados a temperaturas distintas (3 y 8 °C, respectivamente). Es de amplio conocimiento que la temperatura tiene una relación directa con el metabolismo de la fruta y su vida en poscosecha, y b) a la mayor velocidad de transferencia de agua en los procesos difusionales por el incremento de temperatura.

Como se ha venido mencionando, muchos estudios sugieren que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la matriz del alimento que se está evaluando, ya que dosis similares tienen efectos diferentes. Con respecto a este ítem, Xu y col. (2016) observaron tasas de pérdida

de peso en los frutos de arándano que oscilaron entre 1,6 y 2,6 % dependiendo del tratamiento. Después de 8 días de almacenamiento ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), los frutos irradiados (4 kJ/m^2) presentaron porcentajes significativamente más bajos (1,6 %) respecto al control (2,6 %). Los autores mencionaron que estos resultados se obtuvieron debido a la disminución de la tasa de respiración en los frutos tratados con luz UV-C. Resultados similares se observaron en tomates irradiados ($2,56 - 4,83\text{ kJ/m}^2$) y posteriormente almacenados a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después 15 días de almacenamiento, el porcentaje de pérdida de peso fue de aproximadamente 7 % versus 13,5 % en los frutos no irradiados (Pinheiro y col., 2015). Sin embargo, en un estudio realizado por Cote y col. (2013) se observaron pérdidas de peso similares en frutillas control e irradiadas (4 kJ/m^2) después de 3 y 5 días de almacenamiento (6 y 11 %, respectivamente) a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4.4 Parámetros y funciones colorimétricas

Se analizaron los cambios en el color de los frutos FF, control 0 kJ/m^2 y los tratados con luz UV-C a distintas dosis de irradiación ($5,3$ y $11,4\text{ kJ/m}^2$), almacenados durante 15 días a $8 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, según lo descrito en el **ítem 3.8.4**.

Los valores medios de los parámetros L^* , a^* , b^* y de las funciones de color C^* y h obtenidos para las muestras de FF, control 0 kJ/m^2 y tratados se muestran en la **Tabla 4-17**.

Para el análisis estadístico de cada uno de los parámetros de color se realizó una comparación de modelos lineales generales mixtos (GLMMs). Los parámetros L^* , b^* y la función C^* mostraron interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{9, 291} = 15,58$, $p < 0,0001$; $F_{9, 291} = 2,10$, $p = 0,0297$; $F_{9, 291} = 2,02$, $p = 0,0360$, respectivamente). Por el contrario, el parámetro a^* y la función h no mostraron interacción significativa entre los factores ya mencionados.

Una luminosidad (L^*) significativamente mayor se observó en los FF desde el inicio del ensayo. El parámetro L^* de los FF tomo valores distintos a los de las muestras control 0 kJ/m^2 y los tratados con luz UV-C desde el inicio del ensayo hasta el final del mismo (día 15). La luminosidad en los FF fue al menos un 10 % superior con respecto al resto de muestras, sin embargo este porcentaje fue disminuyendo cada vez más conforme aumentaron los días de almacenamiento.

Tabla 4-17. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de los parámetros y funciones de color de los frutos de arándano fresco (FF), arándano control 0 kJ/m² y arándano tratado con luz UV-C a distintas dosis (5,34; 11,4 kJ/m²) y almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	L*		a*		b*		C*		h	
0	FF	24,6 ± 1,0	a	0,2 ± 0,7	a,A	-3,7 ± 0,6	a	3,8 ± 0,8	a	272 ± 7	a,A
	0 kJ/m ²	20,7 ± 1,2	e	-0,1 ± 0,3	b,A	-2,4 ± 0,6	c	2,4 ± 0,6	c	268 ± 7	b,A
	5,3 kJ/m ²	22,0 ± 1,3	e	0,1 ± 0,3	a,A	-2,5 ± 0,7	c	2,6 ± 0,7	c	270 ± 6	c,A
	11,4 kJ/m ²	21,0 ± 0,9	e	0,0 ± 0,1	a,A	-2,4 ± 0,6	c	2,4 ± 0,6	c	269 ± 3	c,A
5	FF	23,9 ± 1,4	b	-0,1 ± 0,1	a,B	-3,8 ± 0,7	a	3,8 ± 0,6	a	269 ± 2	a,B
	0 kJ/m ²	19,4 ± 2,0	f	-0,2 ± 0,2	b,B	-2,6 ± 0,6	c	2,6 ± 0,6	c	264 ± 4	b,B
	5,3 kJ/m ²	19,9 ± 1,6	f	-0,1 ± 0,2	a,B	-2,6 ± 0,6	c	2,6 ± 0,6	c	268 ± 5	c,B
	11,4 kJ/m ²	20,1 ± 0,9	f	-0,1 ± 0,1	a,B	-2,3 ± 0,6	c	2,3 ± 0,6	c	266 ± 5	c,B
10	FF	22,9 ± 1,2	c	0,0 ± 0,3	a,B	-3,4 ± 0,7	b	3,4 ± 0,7	b	270 ± 5	a,B
	0 kJ/m ²	21,2 ± 1,0	e	-0,2 ± 0,2	b,B	-2,6 ± 0,5	c	2,6 ± 0,5	c	265 ± 4	b,B
	5,3 kJ/m ²	20,2 ± 1,3	f	-0,2 ± 0,2	a,B	-2,6 ± 0,5	c	2,6 ± 0,6	c	267 ± 6	c,B
	11,4 kJ/m ²	19,8 ± 0,9	f	-0,2 ± 0,1	a,B	-2,4 ± 0,5	c	2,4 ± 0,5	c	266 ± 3	c,B
15	FF	21,8 ± 1,8	d	-0,1 ± 0,4	a,B	-4,3 ± 0,6	d	4,3 ± 0,6	d	269 ± 5	a,C
	0 kJ/m ²	20,4 ± 1,9	f	-0,2 ± 0,2	b,B	-2,9 ± 0,5	b	2,9 ± 0,5	b	266 ± 4	b,C
	5,3 kJ/m ²	21,0 ± 1,6	e	-0,1 ± 0,2	a,B	-3,2 ± 0,6	b	3,2 ± 0,6	b	268 ± 4	c,C
	11,4 kJ/m ²	20,3 ± 1,2	f	-0,1 ± 0,3	a,B	-2,9 ± 0,7	b	2,9 ± 0,7	b	269 ± 5	c,C

Los resultados fueron expresados como el promedio (n = 30) ± la desviación estándar de la muestra.

Los valores promedios de una misma columna identificados con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas (p < 0,05) entre días de almacenamiento.

Por otro lado, los valores de la luminosidad de las muestras control 0 kJ/m² y las tratadas con luz UV-C no fueron significativamente diferentes inmediatamente después del tratamientos y durante los primeros 5 días de almacenamiento; a partir del día 10 el análisis estadístico señaló algunas diferencias, sin embargo estas diferencias resultaron ser muy pequeñas.

El análisis estadístico encontró diferencias significativas para el parámetro **a*** de las muestras control 0 kJ/m² respecto a las FF y las irradiadas. Durante el almacenamiento, los valores del parámetro **a*** en el día 0 fueron significativamente diferentes al resto de días evaluados.

El parámetro **b*** en todas las muestras analizadas presentó valores negativos, correspondientes al color azul. Los frutos FF, en el día 0, 5, 10 y 15 de almacenamiento presentaron valores de **b*** significativamente más bajos respecto a los frutos control 0 kJ/m² y frutos irradiados. Los valores de **b*** en los frutos control 0 kJ/m² y los frutos irradiados no presentaron diferencias significativas entre sí y permanecieron prácticamente invariables durante el almacenamiento, excepto en el día 15, en donde se observó una pequeña disminución significativa.

Para el parámetro **C*** se obtuvieron valores bajos, los cuales denotan un bajo grado de saturación y por tanto un color grisáceo en los frutos. Los frutos FF presentaron valores de **C*** significativamente más altos respecto a los frutos control 0 kJ/m² y los frutos irradiados tanto en el día 0, como el resto del almacenamiento.

La tonalidad del color **h** de los frutos de arándano fresco, control 0 kJ/m² y tratados mostraron valores situados en el tono azul-rojo (ángulos de tono entre 264° y 272°). De acuerdo al análisis estadístico realizado, los valores de **h** en las muestras FF fueron significativamente más altos que los valores de las muestras control 0 kJ/m² y las muestras tratadas con luz UV-C. Así mismo, los valores del control 0 kJ/m² fueron significativamente más bajos que el resto de las muestras. No se observaron diferencias significativas entre muestras irradiadas. Aunque el análisis estadístico señaló diferencias significativas durante el almacenamiento, no se observó una tendencia clara de los valores de **h** en todas las muestras.

En términos generales los parámetros que más difirieron entre las muestras tratadas, control 0 kJ/m² y las muestras FF fueron **L*** y **b***. El parámetro **L*** de las muestras irradiadas y las control 0 kJ/m² presentaron valores menores, mientras que los valores del parámetro **b*** fueron mayores con respecto a las muestras FF en el día 0, así como durante el almacenamiento. Este comportamiento del color de los frutos agitados (control 0 kJ/m² e irradiados) respecto a los que no lo fueron (FF), podría deberse parcialmente a que los valores de **L*** y **b*** se vieron influenciados

por la redistribución de la ceras y la posible remoción de las mismas en algunas zonas del arándano, observándose la superficie de los frutos más oscura (los valores de L^* decrecieron) y de un azul menos intenso (los valores de b^* se incrementaron).

Chu y col. (2018) señalaron que en ciertas frutas como las bayas de uva o el arándano, los valores de L^* y b^* podrían estar influenciados por las ceras epicuticulares. Estos autores encontraron que cuando esta capa de ceras fue removida de la superficie de los arándanos, los valores de L^* decrecieron mientras que los de b^* se incrementaron, indicando de esta forma que la superficie parecía más oscura y de un azul menos intenso. Los resultados obtenidos por dichos autores se corresponden con lo encontrado en esta tesis.

Se han reportado varios estudios con respecto al efecto de la luz UV-C en diferentes frutas; los resultados obtenidos dependieron de las matrices estudiadas, las dosis aplicadas y las condiciones de tratamiento. Por ejemplo, en arándanos irradiados con dosis de 4 kJ/m^2 no se observaron cambios negativos en el color. Los valores de los parámetros L^* , a^* y b^* de los frutos tratados no fueron significativamente diferentes al control (Xu y col., 2016; Xu y Liu, 2017). Song y col. (2011) señalaron que los frutos de tomate cherry no presentaron diferencias significativas entre los valores de L^* , a^* y b^* de los frutos tratados con luz UV-C y los controles. Es importante señalar que los estudios antes mencionados se realizaron con frutos completamente maduros (color totalmente desarrollado) y los mismos no fueron agitados, sino irradiados manualmente por un lado y por el otro, es decir las ceras no estuvieron constantemente en contacto con algún equipo (agitador) que removiera mecánicamente las mismas mientras se irradiaban los frutos, como en el presente estudio. Khademi y col. (2013) observó una ligera disminución significativa en los valores de L^* en los frutos de caqui irradiados ($1,5 - 3 \text{ kJ/m}^2$); estos autores señalaron que la disminución en los valores de L^* inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C pudo deberse a un leve pardeamiento producido en la superficie de las frutas después del tratamiento; el mismo que pudo luego verse inhibido durante el almacenamiento a baja temperatura (4 meses, 1°C). En frutos de ananá, Sari y col. (2016) no observaron efectos negativos en el color de los frutos irradiados ($0 - 39,6 \text{ kJ/m}^2$) y posteriormente almacenados durante 28 días (10°C). Durante el almacenamiento los valores de L^* disminuyeron, mientras que a^* y b^* se incrementaron tanto en frutos control como los tratados.

Por otra parte, el estado de madures del fruto al momento de evaluar el efecto de la luz UV-C es muy importante. Algunos estudios en donde se evalúa la evolución de la maduración de los

frutos y con ello el desarrollo del color han reportado efectos importantes de la luz UV-C. Maharaj y col. (1999) encontraron un retraso significativo en el progreso de la senescencia en frutos de tomate irradiados ($3,7 \text{ kJ/m}^2$ de luz UV-C) y como resultado, el retraso en el desarrollo del color rojo en los frutos almacenados durante 35 días a 16°C . Estos autores mencionaron que el retraso en la senescencia de estos frutos se atribuye en parte al incremento de los niveles de putrescina libre en el pericarpio de los frutos irradiados con la dosis hórmetica antes mencionada. Después de 21 días de almacenamiento dichos autores reportaron niveles de putrescina equivalentes a 39 y $452 \mu\text{mol.Kg}^{-1}$ en los frutos control e irradiados, respectivamente. Pinheiro y col. (2015) obtuvieron resultados similares en frutos de tomate.

4.2.5 Compuestos bioactivos (antocianinas, compuestos fenólicos) y capacidad antioxidante.

Las determinaciones del contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se realizaron para determinadas dosis de radiación UV-C ($5,34$; $11,4 \text{ kJ/m}^2$) y tiempos de almacenamiento, en función de los resultados hasta aquí detallados.

4.2.5.1 Contenido de antocianinas

Los valores obtenidos del contenido de antocianinas en las muestras analizadas, expresados como miligramos de cianidina -3-glucósido presentes en 100 gramos de masa seca ($\text{mg cia-3-glu}/100 \text{ g m.s}$), se muestran en la **Figura 4-2-7 a** y en la **Tabla 4-18**.

Se aplicó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y control. La interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó no significativa ($F_{4, 33} = 0,60$; $p = 0,6655$). Sólo el efecto principal “tiempo de almacenamiento” resultó significativo ($F_{2, 33} = 3,50$; $p = 0,0420$).

Tabla 4-18. Contenido de antocianinas por cada 100 g de masa seca (mg cia-3-glu/100 g m.s) de frutos de arándano fresco (FF) y tratado con luz UV-C a distintas dosis: 5,34 y 11,4 kJ/m², almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio	
	0	10	15		
FF	784 \pm 142	924 \pm 78	827 \pm 73	850 \pm 109	a
5,3 kJ/m ²	694 \pm 89	829 \pm 102	916 \pm 261	822 \pm 186	a
11,4 kJ/m ²	802 \pm 192	919 \pm 129	977 \pm 213	898 \pm 187	a
Promedio	763 \pm 147	889 \pm 105	907 \pm 195		
	A	B	B		

Los resultados fueron expresados como el promedio (n=5) \pm la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Durante el almacenamiento, en general se observó un aumento en el contenido de antocianinas en todos los casos; el mismo resultó significativo al alcanzar los 10 días de almacenamiento. En cuanto a las muestras FF, el contenido de antocianinas se incrementó significativamente después de los 10 de almacenamiento y aunque en el día 15 se observó una ligera disminución, ésta no resultó significativa.

Con respecto a las muestras irradiadas, entre el día 0 y 10 de almacenamiento el contenido de antocianinas aumentó significativamente para ambas dosis. En los frutos irradiados con 5,34 kJ/m², el incremento fue de aproximadamente 16 %, mientras que en los tratados con dosis de 11,4 kJ/m² el incremento fue de aproximadamente 13%. El incremento en el contenido de antocianinas fue aún mayor después de los 15 días de almacenamiento: el mismo fue de 24 y 18 % para las dosis de 5,34 y 11,4 kJ/m², respectivamente. Los valores de antocianinas de las muestras irradiadas con la dosis de 5,34 kJ/m² presentaron el mayor incremento, tanto en el día 10 como en el día 15 de almacenamiento, respecto del día 0.

En el día 0 y en el día 10, el contenido de antocianinas en los frutos irradiados fue ligeramente inferior a los FF. Sin embargo, al día 15 de almacenamiento esta tendencia se revirtió: el contenido de antocianinas en los frutos irradiados alcanzó valores ligeramente superiores a los de los FF. A pesar de ello, debido a la gran variabilidad en los valores de los frutos irradiados, dicha diferencia entre los frutos tratados y FF no alcanzó a ser significativa.

4.2.5.2 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales obtenido para las muestras FF y las irradiadas con luz UV-C a distintas dosis (5,34 y 11,4 kJ/m²) se muestra en la **Figura 4-2-7 b** y en la **Tabla 4-19**.

Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de dos factores, el cual señaló que no hubo interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{4,33} = 0,71$; $p = 0,5898$); tampoco se encontró diferencias significativas en cada uno de los factores principales ($F_{2,33} = 1,13$; $p = 0,3354$; $F_{2,33} = 0,99$; $p = 0,3830$, respectivamente).

Para un mismo día de almacenamiento, el contenido de fenoles totales en las muestras irradiadas con una dosis de 5,34 kJ/m² presentó valores menores respecto de los FF, aunque esta diferencia no fue significativa, manteniéndose este comportamiento durante todo el almacenamiento. Por otro lado, las muestras irradiadas con una dosis de 11,4 kJ/m² mostraron un comportamiento ligeramente distinto: al día 0 el contenido de fenoles totales de estas muestras fue pronunciadamente menor al de los FF; al día 10 de almacenamiento el contenido de fenoles totales en las muestras FF y las irradiadas con esta dosis fueron similares; al día 15 las muestras irradiadas con 11,4 kJ/m² presentaron un ligero aumento no significativo respecto a las muestras FF.

Al igual que en el caso de antocianinas, es posible que por la alta variabilidad en el contenido de fenoles totales en las muestras irradiadas especialmente, estas diferencias no se reflejaron en el análisis estadístico

Tabla 4-19. Contenido de fenoles totales por cada 100 g masa seca (mg EAG/100 g m.s) de frutos de arándano fresco (FF) y tratados con luz UV-C a distintas dosis (5,34 y 11,4 kJ/m²), almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio	
	0	10	15		
FF	1966 ± 360	1981 ± 177	1834 ± 130	1924 ± 223	a
5,3 kJ/m ²	1729 ± 96	1883 ± 196	1749 ± 242	1791 ± 192	a
11,4 kJ/m ²	1679 ± 297	1906 ± 310	1924 ± 318	1832 ± 304	a
Promedio	1783 ± 284	1925 ± 214	1836 ± 236		
	A	A	A		

Los resultados fueron expresados como el promedio ($n=5$) ± la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

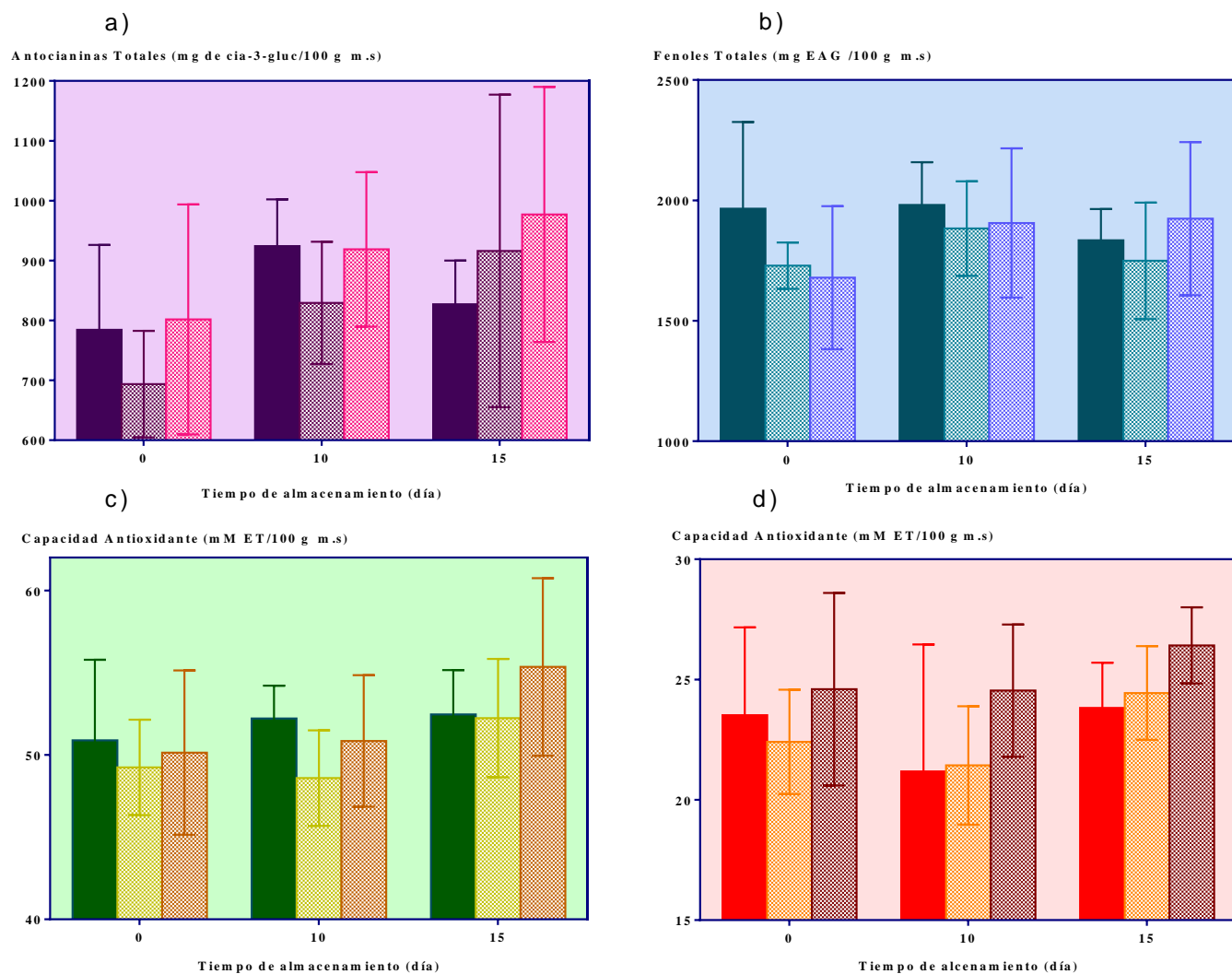


Figura 4-2-7. Valores promedio de: contenido de antocianinas (a); fenoles totales (b), capacidad antioxidante ABTS (c) y ORAC (d) de arándano frescos e irradiados con luz UV-C en distintos dosis y almacenados a 8 °C durante 15 días. FF: ●,●,●,●,●; 5,34 kJ/m²: ●,●,●,●,●; 11,4 kJ/m²: ●,●,●,●,●. Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

4.2.5.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante (CA) de los frutos de arándanos frescos e irradiados con luz UV-C fue determinada mediante los métodos ABTS y ORAC.

Método ABTS

A modo de ejemplo, en la **Figura 4-2-8 a** se muestra una curva de calibración de Trolox utilizada en la determinación de CA por el método de ABTS. Los valores obtenidos por este método se muestran en la **Tabla 4-20** y en la **Figura 4-2-7 c**, expresados en mM ET/ 100 g de masa seca (mM ET/100 g m.s). Se realizó un ANOVA de dos factores. No hubo interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{4,33} = 0,79$; $p = 0,5413$).

No se encontraron diferencias significativas en los valores de CA entre las muestras control (FF) y las irradiadas con luz UV-C ($F_{4,33} = 1,46$; $p = 0,2460$). Los valores de CA de los frutos irradiados respecto a los FF fueron ligeramente inferiores en los días 0 y 10, mientras que en el día 15 los valores de los frutos irradiados con una dosis de $11,4 \text{ kJ/m}^2$ presentaron valores ligeramente superiores a los FF; sin embargo el incremento no fue significativo. Los valores de CA de las muestras irradiadas y las FF presentaron diferencias significativas ($F_{4,33} = 3,97$; $p = 0,0286$) durante el almacenamiento.

Tabla 4-20. Capacidad antioxidante (método ABTS) por cada 100 g de masa seca (mM ET/100 g m.s) de frutos fresco (FF) y tratados con luz UV-C a distintas dosis ($5,34$ y $11,4 \text{ kJ/m}^2$), almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio	
	0	10	15		
FF	51 ± 5	52 ± 2	53 ± 3	51 ± 3	a
$5,3 \text{ kJ/m}^2$	49 ± 3	49 ± 3	52 ± 4	50 ± 3	a
$11,4 \text{ kJ/m}^2$	50 ± 5	51 ± 4	55 ± 5	53 ± 5	a
Promedio	50 ± 3	51 ± 3	53 ± 4		
	A	A,B	B		

Los resultados fueron expresados como el promedio ($n=5$) \pm la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

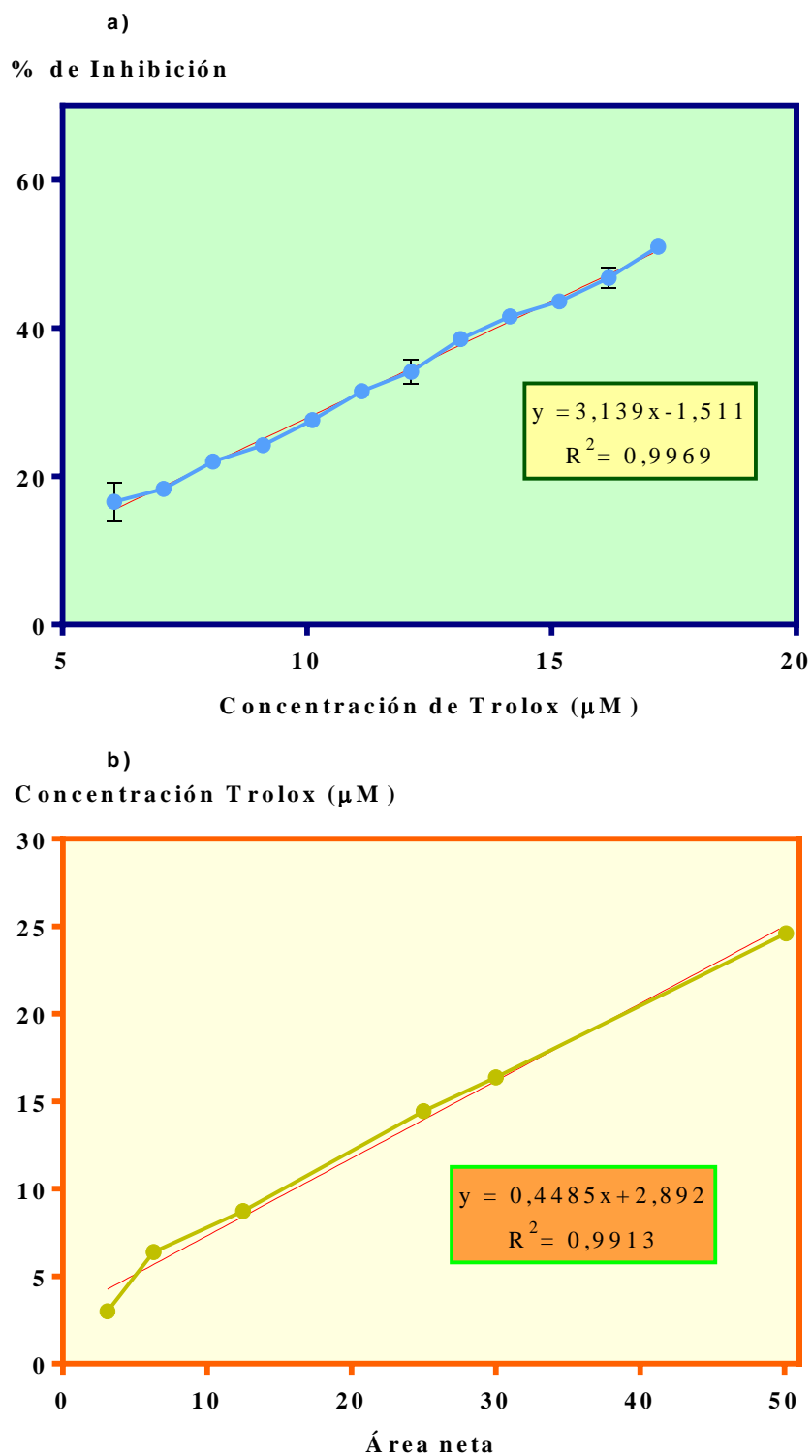


Figura 4-2-8. a) Curva de calibración de Trolox ($n=3$) correspondiente a la técnica ABTS. b) Curva de calibración de Trolox correspondiente a la técnica ORAC.

Se observó que las muestras FF tuvieron un incremento ligero pero significativo en el valor de CA entre el día 0 y 10 de almacenamiento, para luego permanecer dicho valor prácticamente constante hasta el día 15. Por otra parte, las muestras irradiadas con 5,34 y 11,4 kJ/m² de luz UV-C tuvieron un comportamiento distinto a los FF: en general los valores de CA fueron similares durante el día 0 y 10 de almacenamiento, mientras que en el día 15 se observó un incremento significativo para ambas dosis.

Método ORAC

Los valores de CA obtenidos por el método **ORAC** se muestran en la **Tabla 4-21** y en la **Figura 4-2-7 d**. Para cada medición se realizó una curva de calibración de Trolox; en la **Figura 4-2-8 b** se muestra a modo de ejemplo una de estas curvas. El análisis estadístico no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{4, 33} = 0,33$; $p = 0,8551$), así como tampoco en el efecto principal tratamiento ($F_{2, 33} = 1,35$; $p = 0,2724$). Si se observaron diferencias significativas en el efecto principal tiempo de almacenamiento ($F_{2, 33} = 6,16$; $p = 0,0051$).

Tabla 4-21. Capacidad antioxidante (método ORAC) por cada 100 g de masa seca (mM ET/100 g m.s) de frutos fresco (FF) y tratados con luz UV-C a distintas dosis: 5,34 y 11,4 kJ/m², almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio	
	0	10	15		
FF	24 \pm 4	21 \pm 5	24 \pm 2	23 \pm 4	a
5,3 kJ/m ²	22 \pm 2	21 \pm 2	24 \pm 2	23 \pm 3	a
11,4 kJ/m ²	25 \pm 4	25 \pm 3	26 \pm 2	25 \pm 3	a
Promedio	24 \pm 4	22 \pm 4	25 \pm 2		
	A	B	A		

Los resultados fueron expresados como el promedio (n=5) \pm la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Los frutos irradiados con una dosis de 5,34 kJ/m² de luz UV-C mostraron en general valores similares al control (FF) durante todos los días de almacenamiento, no así las muestras irradiadas con una dosis de 11,4 kJ/m², las cuales presentaron valores de CA mayores; no obstante no

resultaron significativas Durante el almacenamiento, el análisis estadístico señaló una disminución significativa en los valores de CA de todas las muestras al día 10 de almacenamiento, mientras que en el día 0 y 15 el contenido de CA de todas las muestras fue similar.

Puntualmente, en lo que se refiere al efecto de la luz UV-C sobre los compuestos bioactivos hasta acá evaluados en los frutos de arándano, la dosis de $11,4 \text{ kJ/m}^2$ en todos los casos mostró valores superiores a los FF en el día 15. Sin embargo, la variabilidad de los frutos no permitiría encontrar diferencias significativas.

Correlación entre el contenido de antocianinas y fenoles totales y la capacidad antioxidante

Se analizó la correlación entre cada uno de los compuestos bioactivos antes mencionados y la capacidad antioxidante de la misma forma que se analizó en las muestras ozonizadas.

La **Tabla 4-22** muestra los valores de significación y los coeficientes de correlación para cada uno de los pares ensayados.

Se encontró correlación significativa entre el contenido de antocianinas con fenoles totales y la CA medida por el método de ABTS ($p < 0.001$); no se encontró correlación significativa entre las antocianinas y la CA medida por el método ORAC ($p = 0,4110$). Los valores de los coeficientes de correlación positiva obtenidos entre el contenido de antocianinas con fenoles totales y la CA (ABTS) mostraron una correlación moderada entre estos compuestos ($r = 0,758$ y $r = 0,652$, respectivamente). Esto sugiere que el contenido de fenoles totales y la CA estuvieron influenciados por el contenido de antocianinas presentes en el arándano. La correlación encontrada entre las antocianinas y la CA (ORAC) fue muy baja ($r = 0,126$).

Con respecto al contenido de fenoles totales, al igual que ocurrió con los valores de fenoles totales de la muestras ozonizadas, estos compuestos mostraron una correlación positiva significativa con la CA medida por ABTS, pero no hubo correlación significativa con la capacidad antioxidante medida por ORAC. A pesar de la correlación significativa entre estos compuestos y la CA medida por ABTS, ésta no fue muy alta ($p = 0,496$). No se observó correlación significativa entre las dos metodologías ensayadas para medir CA: ABTS y ORAC ($p = 0,136$).

Tabla 4-22. Coeficientes de significancia y correlación entre los valores de concentración de antocianinas y fenoles totales y la capacidad antioxidante

	Antocianinas	Fenoles	ABTS	ORAC
Antocianinas	1	0,000	0,000	0,411
Fenoles	0,758	1	0,001	0,992
ABTS	0,652	0,496	1	0,136
ORAC	0,126	0,001	0,226	1

Varios estudios han reportado que la luz UV-C induce la producción de algunos compuestos bioactivos en las frutas como una respuesta natural al estrés biológico producido por la irradiación. Se ha reportado que el tratamiento con luz UV-C ha estimulado la síntesis de algunas enzimas involucradas en la síntesis de fenilpropanoides (Rivera-Pastrana y col., 2007; Li y col., 2017). Los compuestos fenólicos fenilpropanoides se inician por la conversión de fenilalanina en ácido cinámico por parte de la fenilalanina amonio-liasa (PAL). Otra enzima involucrada en la ruta fenilpropanoide es la tirosina amonio liasa (TAL), la misma que convierte la tirosina en ácido cumárico. En algunas bayas como uvas, frutilla, o arándano, el perfil de polifenoles se ha visto modificado o mejorado debido a que la luz UV-C estimuló la síntesis de la PAL, TAL y *p*-cumarato ligasa entre otras (González-Barrio y col., 2005; Perkins-Veazie y col., 2008; Li y col., 2014). En durazno, la aplicación con luz UV-C (7,6 kJ/m²) aumentó la síntesis de quitinasa y PAL (El Ghaouth y col., 2003). En uva de mesa, el tratamiento poscosecha con luz UV-C ha incrementó los niveles de estilbenos; los mismo que son de importancia para la salud cardiovascular (González-Barrio y col., 2005; Suzuki y col., 2015).

Específicamente en arándano, Wang y col. (2009) encontraron que los niveles de flavonoides aumentaron considerablemente después de ser irradiados con luz UV-C ; además, la capacidad antioxidante de estos frutos fue significativamente mayor en comparación con los frutos control. Estos autores señalaron que las dosis óptimas para mejorar el contenido de estos biocompuestos fueron 2,15; 4,30 y 6,45 kJ/m² y que la dosis de 0,43 kJ/m² aumentó el contenido de antocianinas y fenoles, pero en menor medida. Además mencionaron que la mayor inducción de estos compuestos, ocurrió inmediatamente después del tratamiento y que el efecto fue disminuyendo en el tiempo. Por tanto, estos datos sugirieron que el uso de luz UV-C en dosis adecuadas podría ser capaz de modificar el contenido de los compuestos bioactivos en el arándano. Perkins-Veazie y col. (2008) evaluaron la respuesta del contenido de antocianinas, fenoles totales y capacidad antioxidante de dos genotipos de arándano (cvs. Collins y Bluecrop) irradiados con diferentes dosis

de luz UV-C (0 - 4 kJ/m²); los resultados obtenidos dependieron del cultivar y de las dosis evaluadas. Los autores indicaron que los valores de antocianinas, fenoles y la CA fueron más elevados en arándanos irradiados correspondientes al cultivar Collins respecto al cultivar Bluecrops. Para antocianinas y CA, los valores más altos se obtuvieron con las dosis de 1 kJ/m² en el caso del cultivar Collins, mientras que para el cultivar Bluecrop los mejores resultados se obtuvieron con las dosis 2 o 4 kJ/m². No se observó un efecto claro de los tratamientos con luz UV-C en el contenido de fenoles totales.

4.2.6 Aportes e integración de resultados

No existen muchos estudios relacionados a los tratamientos poscosecha de frutos de arándano con **luz UV-C**. Perkins-Veazie y col. (2008) y Nguyen y col. (2014) reportaron su efecto inhibitorio en la microflora nativa cuando los frutos de arándano fueron irradiados con luz UV-C (1- 4 kJ/m²). Evaluaron también la pérdida peso y firmeza, encontrando dichos autores resultados disímiles. Perkins-Veazie y col. (2008) mencionaron que no observaron diferencias significativas en estos dos parámetros, entre frutos tratados y control; mientras que Nguyen y col. (2014) señalaron que el tratamiento de luz UV-C retrasó la pérdida de firmeza y pérdida de peso en los arándanos irradiados. Existe un especial interés por la aplicación de la luz UV-C en relación a los compuestos bioactivos de las frutas; en muchos casos se ha encontrado que el contenido de dichos compuestos (antocianinas, fenoles, flavonoides, entre otros) y la capacidad antioxidante se mantuvo o se incrementó, cuando las frutas fueron irradiadas (González-Barrio y col., 2005; Allende y col., 2007; Li y col., 2014; Andrade-Cuvi y col., 2017). En referencia a este tema, Wang y col. (2009) y Perkins-Veazie y col. (2008) reportaron un incremento en el contenido de antocianinas, fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de arándanos irradiados.

No se han encontrado publicaciones en las que se evalúe el efecto de la luz UV-C (dosis bajas y medias) sobre *B. cinerea*, presente natural o artificialmente en frutos de arándano, así como tampoco el impacto de este tratamiento en la estructura de estos frutos durante el almacenamiento. Solamente Fava (2012) evaluó el impacto de la luz UV-C en la micro y ultraestructura del tejido de arándano inmediatamente después de la aplicación del tratamiento

En virtud de lo antes mencionado se destaca el **aporte** de los resultados obtenidos en esta tesis, en los cuales se pudo observar que el tratamiento con luz UV-C en frutos de arándano en las

dosis ensayadas tuvo un efecto inhibitorio en el desarrollo de la micobiota nativa y *B. cinerea* a lo largo del almacenamiento respecto a los FF y el control.

Ninguno de los tratamientos con luz UV-C afectó significativamente el pH, el contenido de acidez titulable, los sólidos solubles y la humedad de los frutos tratados.

Contrariamente a los resultados obtenidos con el tratamiento con ozono, en los frutos irradiados el color y la pérdida de peso fue significativamente diferente a los FF; en ambos casos, dicho comportamiento fue asociado principalmente a la remoción y redistribución de las ceras epicuticulares (observadas en MEBA). La agitación durante el tratamiento fue realizada para lograr una irradiación uniforme en los frutos, pero además fue planteada como un proceso que se asemeje a lo que se haría en una industria a gran escala. Sin embargo, se debería utilizar un movimiento de los frutos poco severo para no afectar las ceras o pensar en un diseño de equipo diferente para obtener uniformidad en la irradiación.

El PP (%) como se ha mencionado es un parámetro de calidad muy importante a controlar ya que pérdidas excesivas de agua se traducirían en una mala apariencia de los frutos. En este contexto, es conveniente mencionar que los frutos irradiados presentaron altos porcentajes de pérdida de peso (entre 4 y 5 %) a los 10 días de almacenamiento, los cuales podrían ser detectables por el consumidor; por tanto, aunque los FI (%) fueron significativamente menores respecto al control, la pérdida de peso (en las condiciones ensayadas) estaría limitando la cantidad de días de almacenamiento de los frutos de arándano.

El tratamiento con luz UV-C no afectó las propiedades mecánicas de los frutos de arándano. El análisis microestructural reveló que el tratamiento con luz UV-C afectó al tejido de los frutos de arándano en menor grado que el ozono y las curvas F vs D correlacionaron con dichas observaciones.

En esta tesis fueron observados resultados distintos a lo reportado por otros autores: los valores de los compuestos bioactivos (contenido de antocianinas y fenoles totales), y de la capacidad antioxidante de los frutos irradiados no fueron significativamente diferentes al control. Esta discrepancia ratificaría lo mencionado por varios autores; la posible respuesta hormética inducida por la luz UV-C depende de la dosis aplicada, la matriz e inclusive el cultivar de un dado fruto.

4.3 APLICACIÓN DE OZONO Y RADIACIÓN UV-C EN COMBINACIÓN

4.3.1 Selección de tratamientos con ozono y radiación UV- C

La selección de la concentración y tiempo de exposición al ozono y la dosis de radiación UV-C para los tratamientos combinados se realizó de acuerdo a los resultados previos obtenidos en cada uno de ellos aplicados en forma individual. En lo que respecta a la etapa de descontaminación con ozono en fase acuosa se seleccionó la concentración de $5,1 \pm 0,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ con un tiempo de exposición de 10 min, mientras que para la descontaminación por exposición a luz UV-C la dosis seleccionada fue $5,3 \text{ kJ/m}^2$. La combinación de los tratamientos se realizó en la secuencia ozonización y posterior exposición a la luz UV- C y también en el orden inverso.

4.3.2 Evaluación de la respuesta microbiológica

4.3.2.1 Desarrollo de la micobiota nativa

La **Figura 4-3-1** muestra la evolución del porcentaje de frutos infectados FI (%), para los frutos frescos (FF), los controles combinados (O_2 10 min - 0 kJ/m^2 ; 0 kJ/m^2 - O_2 10 min), los frutos tratados con ozono ($5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min), los frutos irradiados con luz UV-C ($5,3 \text{ kJ/m}^2$) y los frutos tratados con sus combinaciones: $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min - $5,3 \text{ kJ/m}^2$ (O_3 - UV-C) y $5,3 \text{ kJ/m}^2$ - $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min (UV-C - O_3). Los controles fueron similares a los controles de los tratamientos individuales de ozono o luz UV-C pero en este caso se combinó ambos procedimientos.

En todos los casos, los tratamientos con ozono y/o luz UV-C presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la micobiota

En términos generales, después de 20 días de almacenamiento, los frutos tratados con $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min; $5,3 \text{ kJ/m}^2$ y $5,3 \text{ kJ/m}^2$ - $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min presentaron entre 31 - 37 % menos de crecimiento fúngico con respecto a los FF; mientras que el tratamiento combinado $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min - $5,3 \text{ kJ/m}^2$ presentó 57 % menos de crecimiento.

Si bien los tratamientos con ozono y/o luz UV-C resultaron en un desarrollo fúngico menor que los frutos no tratados, en ningún caso se vio retrasado la aparición del mismo a diferencia de lo descrito anteriormente en los ítems **4.1.2.1** y **4.2.2.1**.

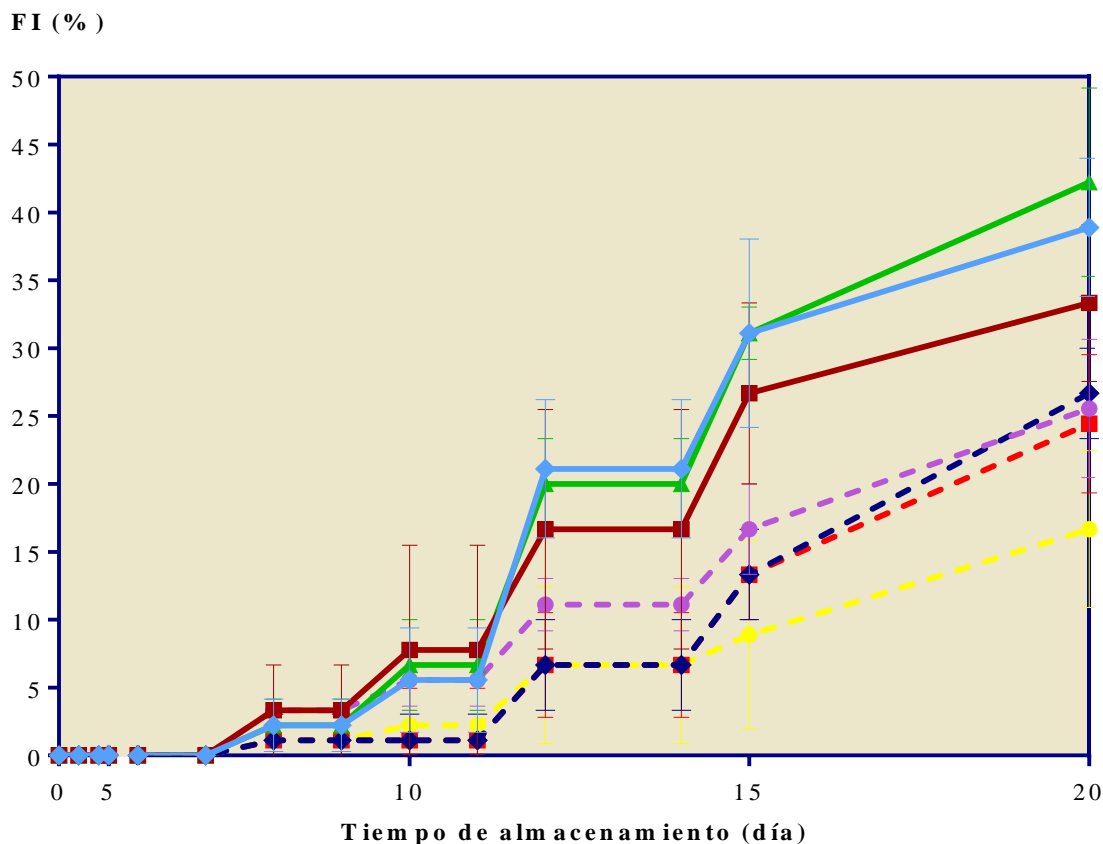


Figura 4-3-1. FI (%) con **microbiota nativa** de arándanos expuestos a distintos tratamientos y almacenados a 8 °C durante 20 días. FF (♦); controles: O₂ 10 min - 0 kJ/m² (■), 0 kJ/m² - O₂ 10 min (▲); frutos ozonizados y/o irradiados: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●), 5,3 kJ/m² (◆), 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m² (■), 5,3 kJ/m² - 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

En la **Tabla 4-23** se detallan los valores de los porcentajes de infección acumulados de frutos infectados durante los 0, 5, 10, 15 y 20 días de almacenamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para establecer diferencias significativas entre muestras tratadas y los controles. Para cumplir con los supuestos de ANOVA (normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas y covarianzas entre tratamientos) los datos fueron transformados a arcoseno (raíz(p)). El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{24, 70} = 0,93$; $p = 0,5663$).

Tabla 4-23. Valores medios del porcentaje de frutos infectados por la micobiota nativa en frutos frescos, controles y tratados con ozono y/o luz UV-C, almacenados a 8 ± 1 °C durante 20 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento					Promedio Total	
	0	5	10	15	20		
	FI (%) \pm DE						
FF	ND	ND	5,6 \pm 3,8	31,1 \pm 6,9	38,9 \pm 5,1	20,7 \pm 16	a
O ₂ 10 min - 0 kJ/m ²	ND	ND	7,8 \pm 7,7	26,7 \pm 6,7	36,7 \pm 5,8	18,2 \pm 14	a
0 kJ/m ² - O ₂ 10 min	ND	ND	6,7 \pm 3,3	31,1 \pm 1,9	42,2 \pm 6,9	20,4 \pm 16	a
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	ND	ND	5,6 \pm 1,9	16,7 \pm 3,3	25,6 \pm 5,1	12,4 \pm 7	b
5,3 kJ/m ²	ND	ND	1,1 \pm 1,9	13,3 \pm 3,3	26,7 \pm 3,3	9,8 \pm 11	b,c
O ₃ - UV-C	ND	ND	2,2 \pm 3,8	8,9 \pm 6,9	16,7 \pm 5,8	7,0 \pm 7	c
UV-C - O ₃	ND	ND	1,1 \pm 3,8	13,3 \pm 3,3	24,4 \pm 5,1	9,8 \pm 10	b,c
Promedio Total			4,4 \pm 4,3	20,0 \pm 9,5	30,2 \pm 9,9		
			A	B	C		

ND: visualmente sin desarrollo.

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Al contrastar las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C respecto a las muestras FF y controles combinados, se observó que el FI (%) en las muestras tratadas fue significativamente menor ($F_{6, 70} = 15,49$; $p < 0, 0001$). Sin embargo, entre los distintos tratamientos combinados no se observaron diferencias significativas en el FI (%). Después de 20 días de almacenamiento en promedio el menor porcentaje de frutos infectados se obtuvo con el tratamiento de O_3 - UV-C pero dicha disminución no fue significativa respecto al resto de los tratamientos. Entre los frutos FF y los dos controles evaluados no se observaron diferencias significativas en el FI (%) (**Tabla 4-23**).

La evolución del FI (%) fue significativamente diferente para los distintos períodos de almacenamiento evaluados ($F_{4, 70} = 106$; $p < 0, 0001$). Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentaron los días de almacenamiento, siendo FF y los controles los que mayor porcentaje de frutos infectados presentaron durante todo el almacenamiento.

La **Tabla 4-23** se presenta los resultados resumidos para los días 0, 5, 10, 15 y 20; sin embargo, la inspección visual fue realizada diariamente y el análisis estadístico incluyó todos los días donde se presentó crecimiento fúngico.

4.3.2.2 Desarrollo de *B. cinerea*.

La descontaminación de los frutos inoculados con *B. cinerea* se realizó con los mismos tratamientos de ozono y/o luz UV-C propuestos para el estudio de micoflora nativa en el ítem **4.3.2.1**. Los **controles** en este caso fueron: a) frutos inoculados (FF_(B.c)) y b) frutos inoculados, inmersos en agua destilada burbujeada con O_2 y posteriormente agitados en la cabina de luz UV-C con las luces apagadas (O_2 10 min - 0 kJ/m^2 (B.c)).

En la **Figura 4-3-2** se observa la evolución del FI (%) para los controles y los frutos tratados con ozono y/o luz UV-C. El control inoculado (FF_(B.c)) presentó infección con el hongo a partir del día 4 de almacenamiento, mientras que en el control (O_2 10 min - 0 kJ/m^2 (B.c)) y en los frutos tratados con ozono y/o luz UV-C el crecimiento de *B. cinerea* se detectó a partir del día 6.

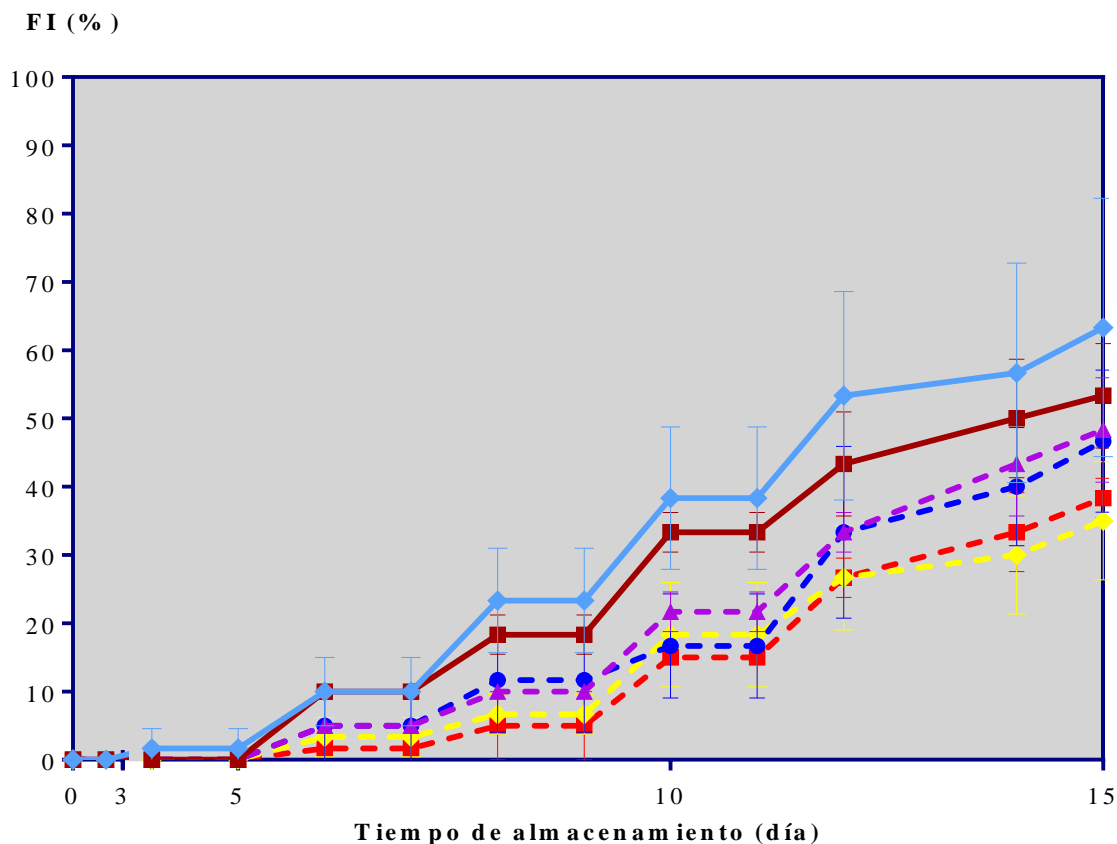


Figura 4-3-2. FI (%) con *B. cinerea* BAFC 3003 de arándanos expuestos a distintos tratamientos y almacenados a 8 °C durante 15 días. Controles: FF_(B.C) (♦), O₂ 10 min - 0 kJ/m²_(B.C) (■); frutos ozonizados y/o irradiados: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●), 5,3 kJ/m² (♦), 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m² (●), 5,3 kJ/m² - 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

En todos los casos se observó un efecto inhibitorio en el desarrollo del moho cuando los frutos fueron tratados con ozono, luz UV-C, o sus combinaciones.

En la **Tabla 4-24** se detallan los valores de los porcentajes acumulados de frutos infectados durante los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Al igual que para el ítem anterior, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores para establecer diferencias significativas entre tratamientos. Para cumplir con los supuestos de ANOVA los datos fueron transformados a arcoseno (raíz(p)).

Tabla 4-24. Valores promedio del porcentaje de frutos infectados por *B. cinerea* en frutos frescos, controles y tratados con ozono y/o luz UV-C, almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento									Promedio Total	
	0	5	10			15					
	FI (%) \pm DE										
FF (B.c)	ND	1,7	\pm 2,9	38,3	\pm 10,4	63,3	\pm 18,9	42 \pm 27	a		
O ₂ 10 min-0 kJ/m ² (B.c)	ND	ND		33,3	\pm 2,9	53,3	\pm 7,6	36 \pm 21	a,b		
5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	ND	ND		21,7	\pm 0,0	48,3	\pm 7,6	31 \pm 23	c		
5,3 kJ/m ²	ND	ND		16,7	\pm 7,6	46,7	\pm 10,4	29 \pm 21	c,d		
O ₃ - UV-C	ND	ND		15,0	\pm 0,0	38,3	\pm 2,9	23 \pm 18	c,d		
UV-C - O ₃	ND	ND		18,3	\pm 7,6	35,0	\pm 8,7	23 \pm 17	d		
Promedio Total		0,3	\pm 1	24	\pm 11	48	\pm 13				
		A		B		C					

ND: visualmente sin desarrollo

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar de la muestra.

Las filas identificadas con igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Las columnas identificadas con igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

El análisis estadístico realizado no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{25, 72} = 0,25$; $p = 0,99$). En todos los casos, el porcentaje de frutos infectados en las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C fue significativamente menor ($F_{5, 72} = 20,00$; $p < 0, 0001$) respecto a las muestra control. No se observaron diferencias significativas entre los FI (%) entre los distintos tratamientos ensayados, si bien los valores correspondientes a los tratamientos combinados fue ligeramente menor al final del almacenamiento.

Todos los períodos de tiempo de almacenamiento analizados fueron significativamente diferentes entre sí ($F_{5, 72} = 85,72$; $p < 0, 0001$); el porcentaje de frutos infectados aumentó conforme aumentaron los días de almacenamiento, tanto para los controles, como para las muestras tratadas.

Para *B. cinerea*, las combinaciones evaluadas no mostraron la misma tendencia que la micobiota nativa: el FI (%) fue muy similar a lo largo de todo el almacenamiento para ambas secuencias.

4.3.3 Estudio de la estructura

4.3.3.1 Observación de la microestructura

Tejido de arándano fresco y control

En la **Lámina 4-3-I A, B** se muestra con fines comparativos, el corte transversal de frutos frescos de arándano. El tejido de FF exhibió las mismas características estructurales que las descritas en ítems anteriores (estudio del efecto individual de ozono y luz UV-C).

Para determinar si hubo algún daño microestructural producto de la doble agitación de las muestras tratadas con la combinación se observó el control $0 \text{ kJ/m}^2\text{- O}_2$ 10 min. En **Lámina 4-3-I C, D** se muestran las micrografías correspondientes. El corte transversal del tejido de éstos frutos se observó distinto al corte de los FF; el tejido mostró una fuerte compactación tangencial en algunas zonas del epicarpo (especialmente las células epidérmicas), además de un gran incremento en los espacios intracelulares (EI) entre la primer y segunda capa de células subepidérmicas.

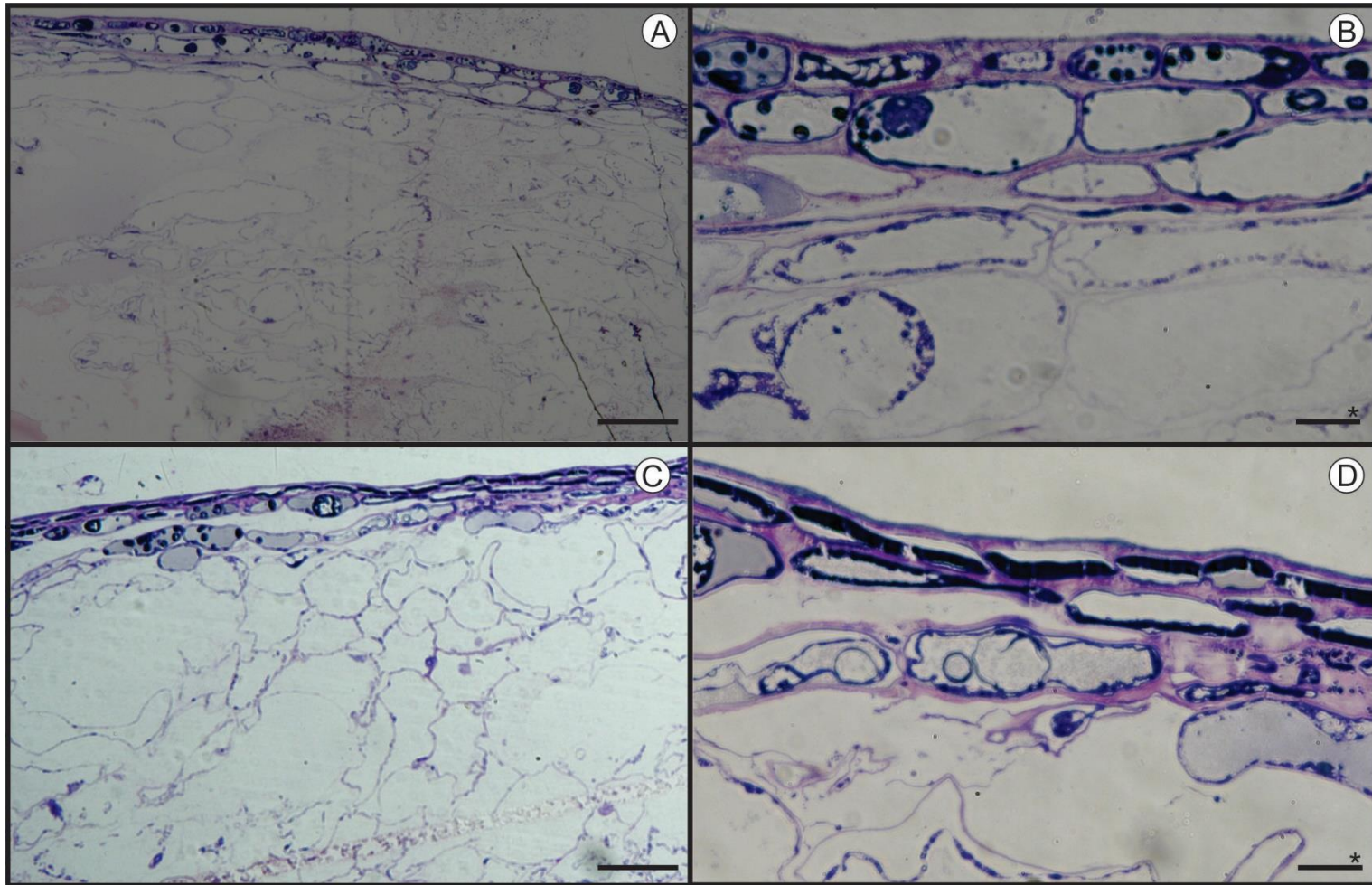


Lámina 4-3-I. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco y control. **A, B:** FF; **C, D:** control 0 kJ/m²- O₂ 10 min. **A, C:** aspecto general; **B, D:**detalle del tejido de arándano. Escala: A, C = 100 µm; B, D = 20 µm.

Las células epidérmicas en las que hubo compactación tangencial se observaron rectangulares, radialmente comprimidas con citoplasma parietal y vacuola central repleta de contenidos. Por otra parte el mesocarpo fue similar al descrito para los FF. Las alteraciones del epicarpo provocadas por la **agitación** fueron mayores que las de las muestras de los tratamientos individuales de luz UV-C y de ozono, si bien la PTE y la PTI presentaron un grado similar de tinción.

Tejido de arándano ozonizado y/o irradiado con luz UV-C

Las micrografías de los frutos ozonizados y/o irradiados se muestran en la **Lámina 4-3-II**. En general, las muestras tratadas con la combinación exhibieron características estructurales similares al control 0 kJ/m²- O₂ 10 min (aunque el incremento de los EI fue más acentuado), mientras que las muestras solamente ozonizadas o irradiadas presentaron ligeras diferencias. El corte transversal del tejido de las muestras tratadas con la combinación (independiente del orden) presentó una fuerte compactación tangencial del epicarpo (**Lámina 4-3-II E-I**) y un pronunciado incremento en los EI entre las capas de células subepidérmicas. Muchas células epidérmicas se observaron rectangulares y radialmente comprimidas, y muy pocas conservaron la forma de las de los FF. La compactación afectó el epicarpo en forma generalizada.

Las microfotografías de los frutos tratados con ozono o luz UV-C (**Lámina 4-3-II A-D**) mostraron un efecto menos drástico del tratamiento. Si bien es cierto que se observaron células epidérmicas ligeramente compactadas (menor grado en los frutos irradiados) y un incremento en los EI de las células epidérmicas (especialmente los frutos ozonizados), estos cambios fueron menores comparados a los de los tejidos tratados con la combinación.

Tejido de de frutos frescos, control y tratados con ozono y/o irradiados con luz UV-C y almacenados en refrigeración

Luego de **15 días** de almacenamiento, el tejido de los FF almacenados no se vio mayormente afectado respecto al día 0 (**Lámina 4-3-III A**). Se observó células epidérmicas cuadrangulares a rectangulares, con numerosas vacuolas y citoplasma denso entre éstas.

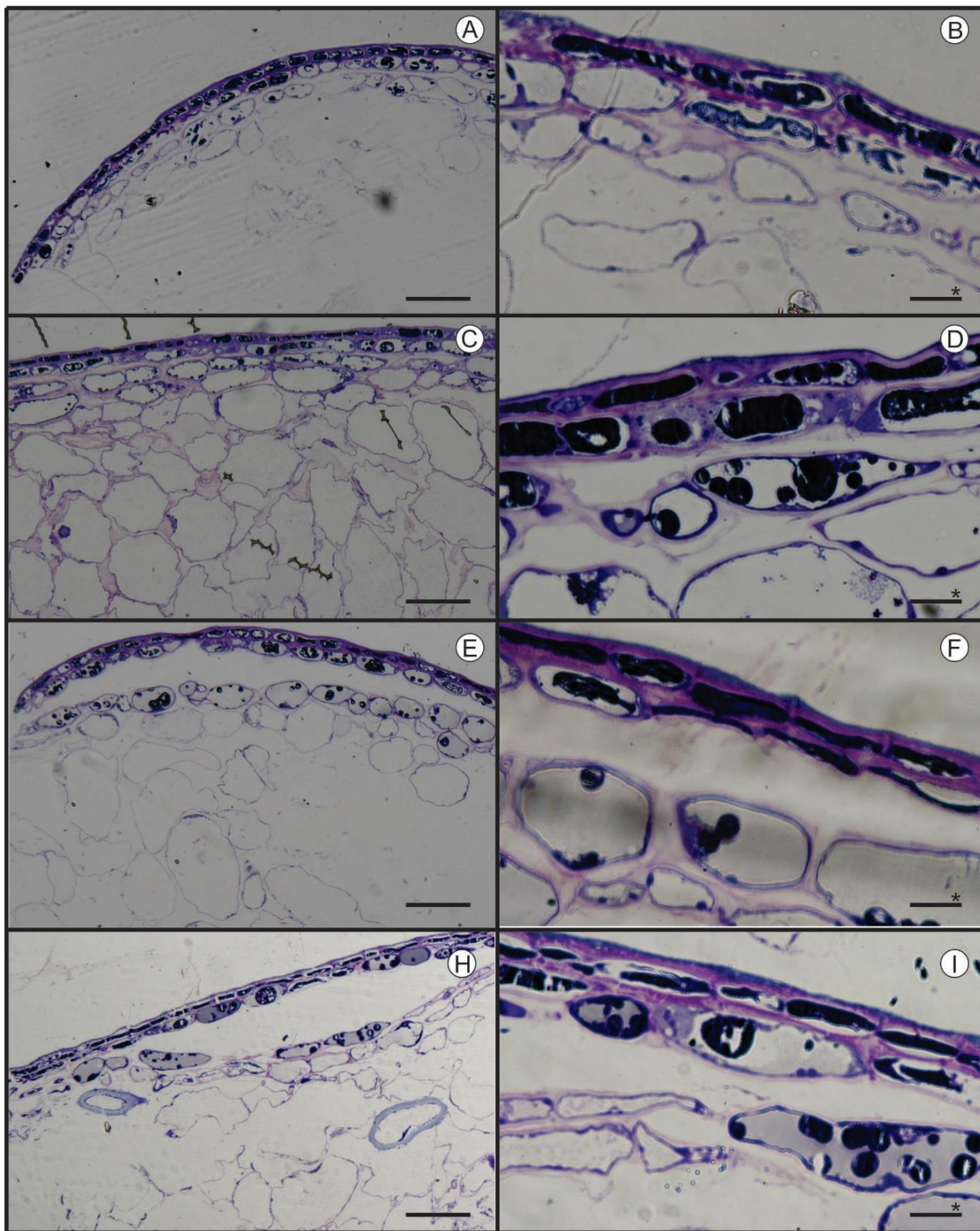


Lámina 4-3-II. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano ozonizados y/o irradiados con luz UV-C. **A, B:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min; **C, D:** 5,3 kJ/m²; **E, F:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m²; **H, I:** 5,3 kJ/m²- 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. Escala: A, C, E, H = 100 µm; B, D, F, I = 20 µm.

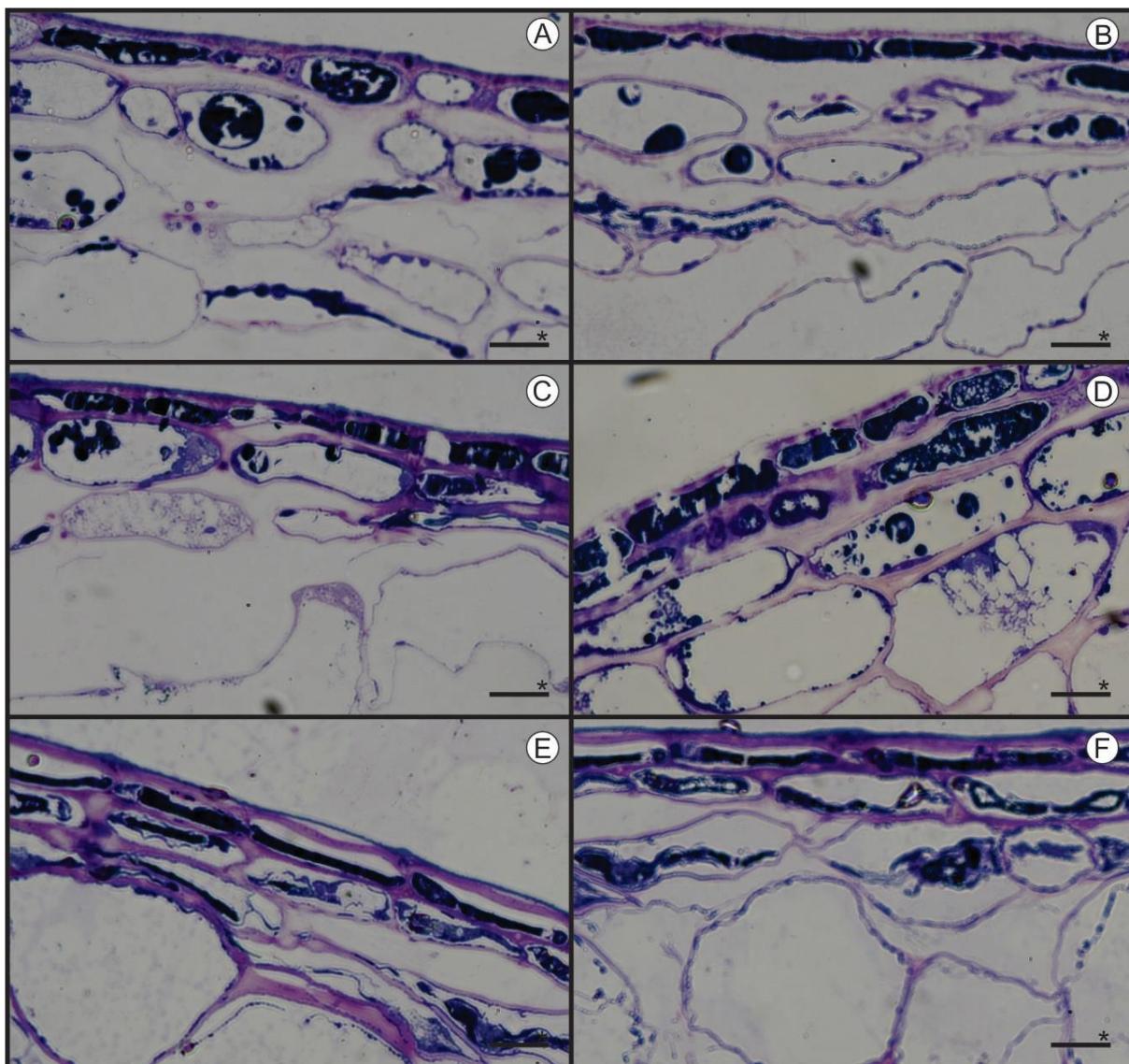


Lámina 4-3-III. Fotomicrografías con MO de frutos de arándano fresco, control y ozonizados y/o irradiados con luz UV-C y almacenados 15 días a 8 ± 1 °C. **A:** FF. **B:** control 0 kJ/m²- O₂ 10 min. **C:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. **D:** 5,3 kJ/m². **E:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m². **F:** 5,3 kJ/m²- 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. Escala: 20 µm.

La PTE se coloreó con azul de toluidina: la cutícula se tiñó de azul intenso con cuñas a nivel de las paredes radiales de las células epidérmicas, la capa cutinizada tomó coloración púrpura. Las capas subepidérmicas al igual que el resto de tejido, incluido mesocarpo, se observó sin alteraciones mayores.

Los frutos control mostraron células epidérmicas compactadas y separadas de la primera capa de las células subepidérmicas. La MC apareció más tenue y más laxa, con signos de degradación (**Lámina 4-3-III B**).

Por otro lado, los frutos tratados almacenados presentaron un deterioro del epicarpo respecto del día 0. En los frutos ozonizados se observó compactación tangencial en varias células epidérmicas y en muy escasas zonas disrupción de la PTE; la cutícula se observó completa en toda la sección del tejido evaluada (**Lámina 4-3-III C**). Los frutos irradiados por el contrario, presentaron escasas zonas de compactación tangencial; sin embargo la cutícula presentó disrupciones en varias zonas, al igual que la PTE (**Lámina 4-3-III D**).

Los frutos ozonizados e irradiados en ambas secuencias se observaron con una fuerte y generalizada compactación tangencial en las células epidérmicas y subepidérmicas. Dichas células evidenciaron en general plasmólisis. La coloración de la cutícula, la capa cutinizada y PTE se observó muy similar al día 0 (**Lámina 4-3-III E-F**).

4.3.3.2 Observación de la ultraestructura

Superficie de arándano fresco y control

En la **Lámina 4-3-IV A, B** se observa la superficie de los FF del lote utilizado en estos estudios. En vista superficial dichas muestras presentaron un comportamiento similar al de los FF descriptos en el capítulo de ozono o luz UV-C.

Para determinar si hubo algún cambio en las ceras epicuticulares producto de la doble agitación en las muestras tratadas con la combinación, se observó por MEBA el control 0 kJ/m²-O₂ 10 min correspondiente a estos tratamientos.

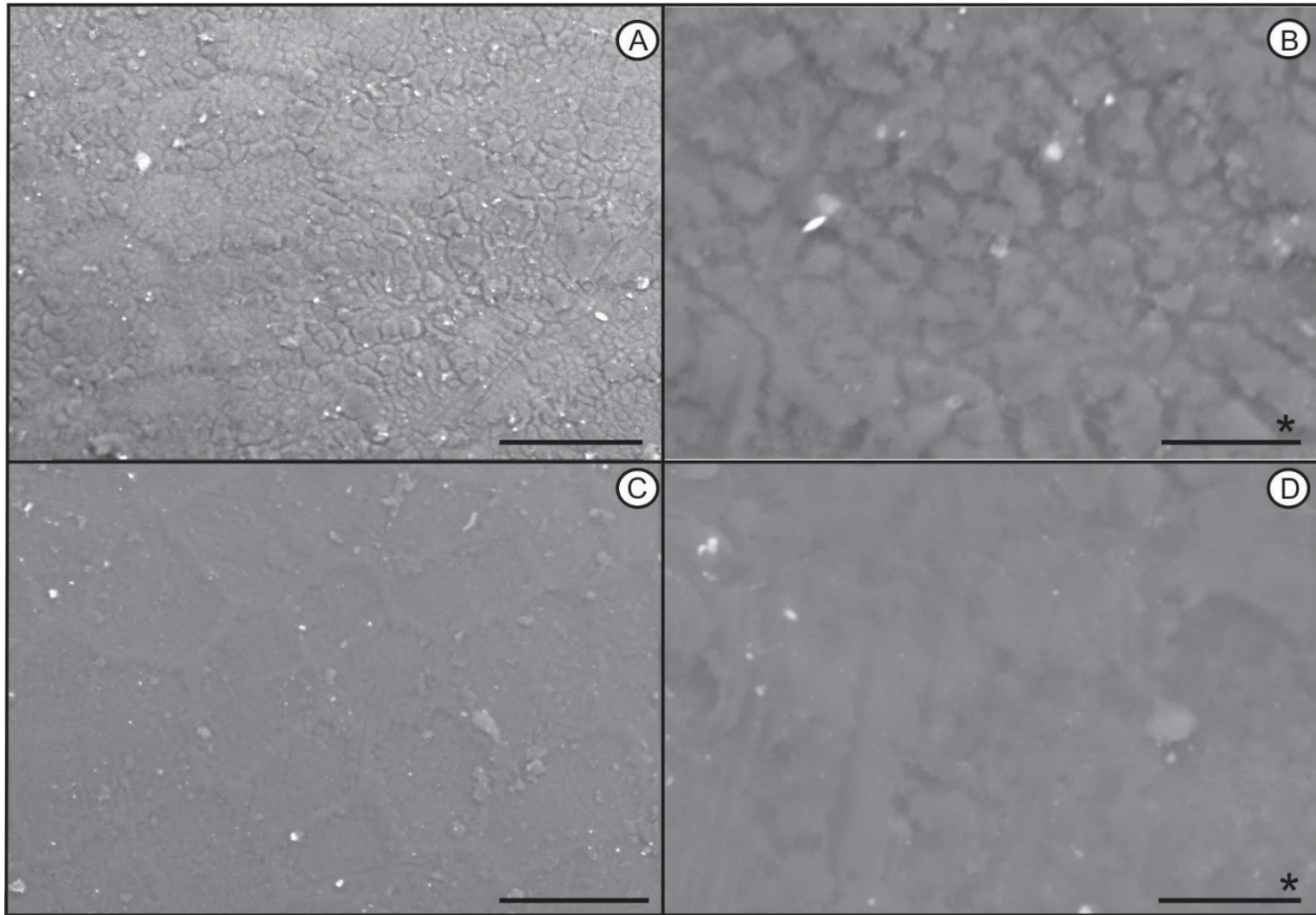


Lámina 4-3-IV. Fotomicrografías con MEBA de frutos frescos y control. **A, B:** FF. **C, D:** control O₂ 10 min - 0 kJ/m². **A, C.** Aspecto general de la superficie de arándano. **B, D** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. Escala: A, C = 100 μm; B, D = 20 μm.

Las ceras epicuticulares de los frutos control (**Lámina 4-1-IV C, D**) se evidenciaron como una capa menos densa (surcos menos profundos) respecto a los FF. Hubo una redistribución de ceras que tendieron a agregarse, esparciéndose sobre la superficie, reduciendo el área de los surcos. Dicho comportamiento es justificable debido a las mismas razones expuestas en los ítems **4.1.4** y **4.2.4**.

Superficie de arándanos tratados con ozono y/o luz UV-C

De igual forma que lo descripto ya en los ítems correspondientes a los tratamientos individuales; las ceras epicuticulares de los frutos ozonizados (**Lámina 4-3-V A, B**) mostraron una leve alteración respecto a los FF, apareciendo las placas de cera con bordes más regulares entre surcos reticulados como en los FF pero menos profundos. En los frutos irradiados (**Lámina 4-1-V C, D**) en cambio se observó alteraciones un poco más pronunciadas que en los frutos ozonizados: las ceras epicuticulares aparecieron como agregados de cristales mucho más grandes de forma indefinida, con menos surcos entre ellos debido a la redistribución de las mismas sobre la superficie.

Independientemente del sentido de los tratamientos (**Lámina 4-3-V E-H**), las muestras tratadas en combinación con ozono y luz UV-C mostraron una fuerte alteración en las ceras epicuticulares; las mismas aparecieron esparcidas sobre la superficie formando una capa de espesor irregular. Debido a la redistribución de las ceras se observaron pocos cristales y surcos característicos. Las ceras aparecerían prácticamente como una sola capa sobre el fruto.

Superficie de arándanos frescos, control y tratados con ozono y/o luz UV-C y almacenados en refrigeración

En la **Lámina 4-3-VI A, B** y **Lámina 4-3-VII A, B** se puede observar que tanto los FF así como los control almacenados durante 10 y 15 días, presentaron un comportamiento similar al día 0; en los FF se observaron cristales de cera y surcos característicos; en primera instancia la densidad de la capa de ceras parecería haber sufrido una leve disminución. Los frutos control en ambos días de almacenamiento se observaron con una capa de ceras delgada, dispersa y en algunas zonas hubo ausencia de las mismas.

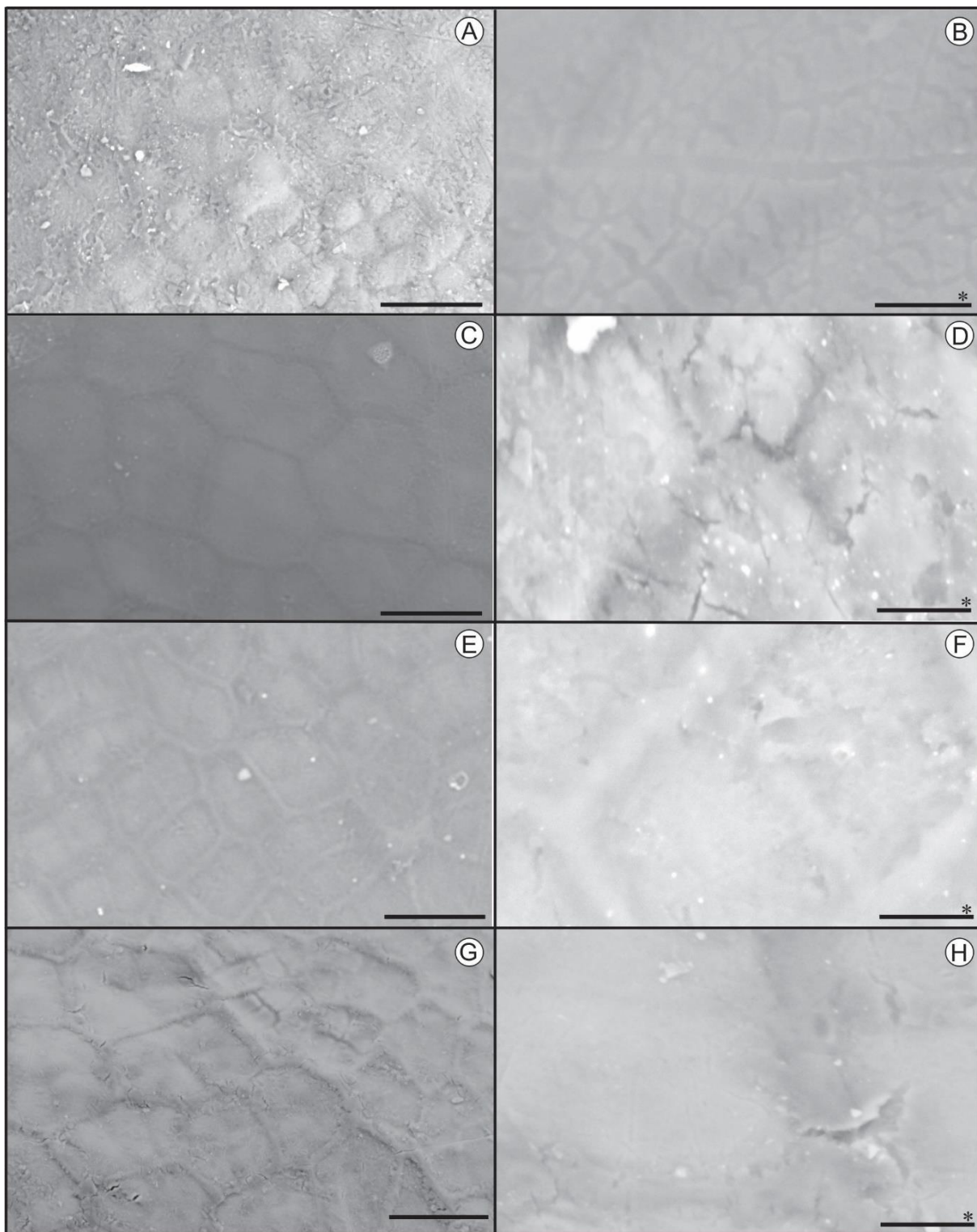


Lámina 4-3-V. Fotomicrografías con MEBA de frutos tratados con ozono y/o luz UV-C. **A, B:** 5,1 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$: 10 min. **C, D:** 5,3 kJ/m^2 . **E, F:** 5,1 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min - 5,3 kJ/m^2 . **G, H:** 5,3 kJ/m^2 - 5,1 mg $\text{O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min. **A, C, E, G:** aspecto general de la superficie de arándano; **B, D, F, H** detalle de las ceras epicuticulares en vista superficial. Escala: A, C, E, G = 100 μm ; B, D, F, H = 20 μm .

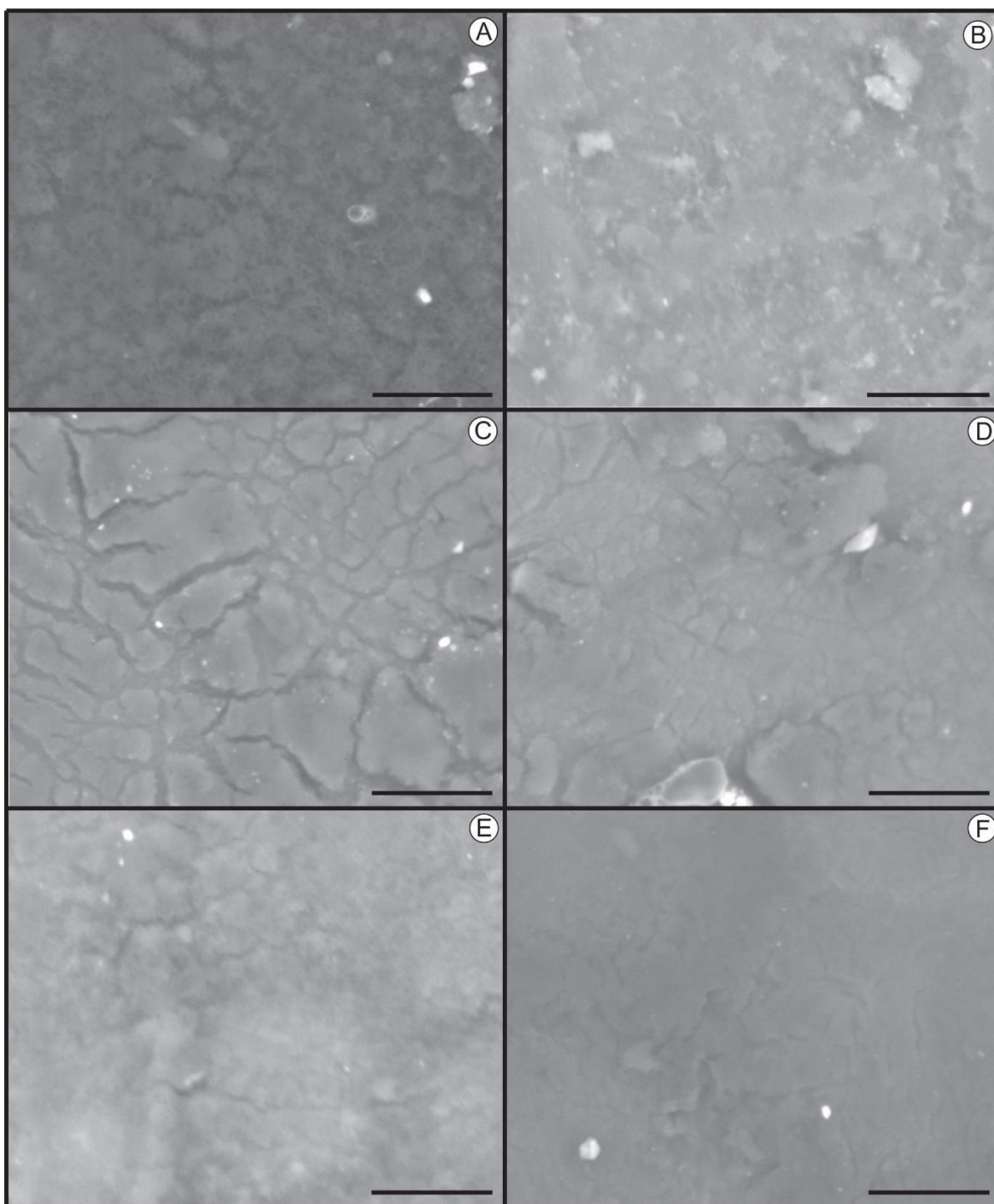


Lámina 4-3-VI. Fotomicrografías con MEBA de frutos frescos, control y tratados con ozono y/o luz UV-C y almacenados 10 días a 8 ± 1 °C. **A:** FF. **B:** control 0 kJ/m²- O₂ 10 min. **C:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. **D:** 5,3 kJ/m². **E:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m². **F:** 5,3 kJ/m²- 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. Escala: 20 µm.

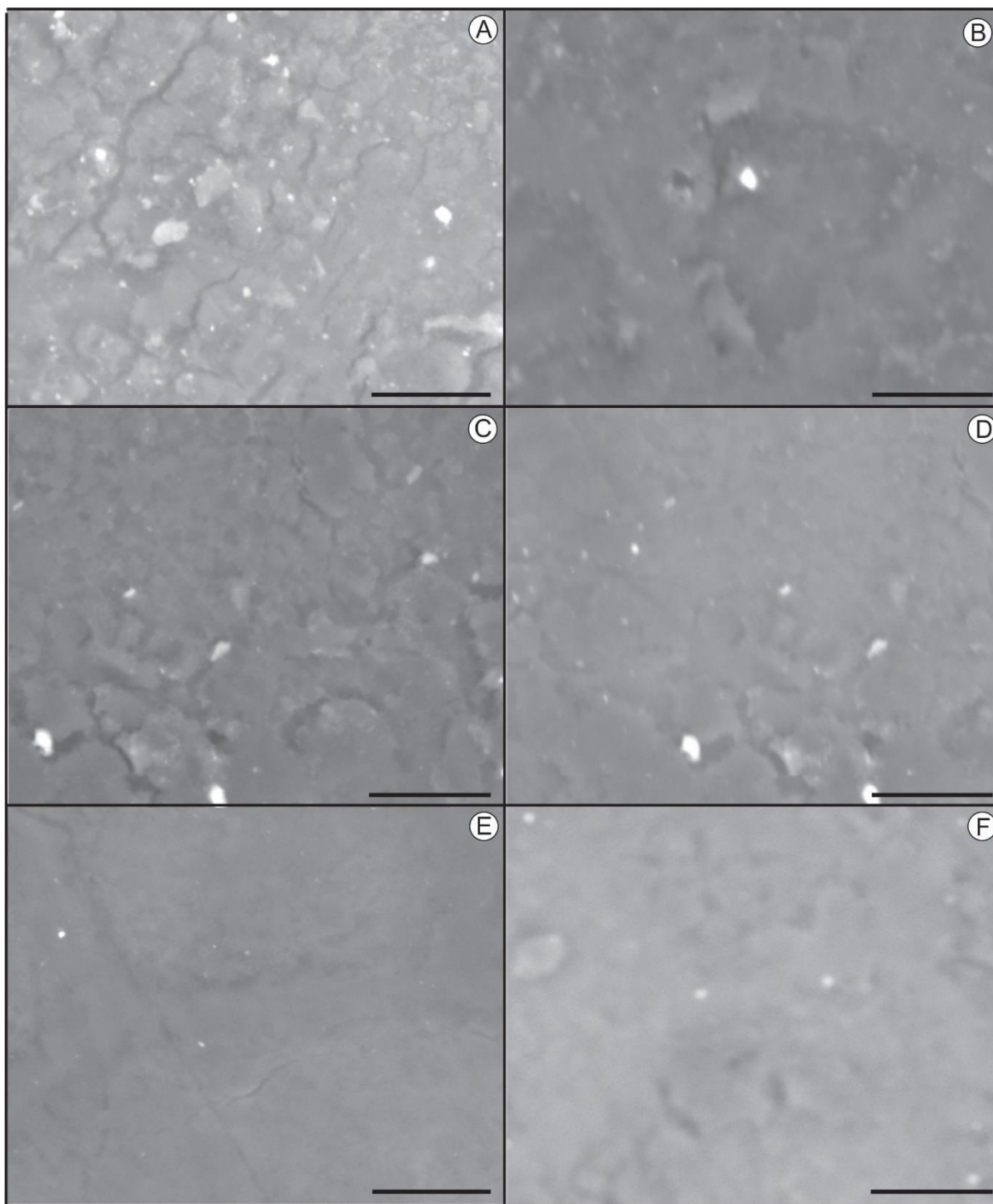


Lámina 4-3-VII. Fotomicrografías con MEBA de frutos frescos, control y tratados con ozono y/o luz UV-C y almacenados 15 días a 8 ± 1 °C. **A:** FF. **B:** control 0 kJ/m² - O₂ 10 min. **C:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. **D:** 5,3 kJ/m². **E:** 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m². **F:** 5,3 kJ/m² - 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min. Escala: 20 μm.

En los frutos ozonizados, las ceras epicuticulares se observaron sin alteraciones al día 10 de almacenamiento con aspecto craquelado, mientras que al día 15 se observaron algunas zonas en donde los cristales de cera aparecían más dispersos formando cristales más chicos (zonas laxas). Del mismo modo, la capa de ceras epicuticulares se visualizó menos densa. Los frutos irradiados por su parte se observaron ligeramente diferentes al día 0, la capa de ceras epicuticulares en el día 10 de almacenamiento se observó más densa respecto al día 15; en la redistribución de las mismas sobre los frutos de arándano no se observó mayores cambios.

En vista superficial, las ceras epicuticulares de los frutos tratados con la combinación y almacenados durante 10 días, presentaron una fuerte separación de las ceras, evidenciándose varias zonas laxas que dieron el aspecto de una capa delgada y algunos casos la ausencia de las mismas ($5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1} \text{ 10 min} - 5,3 \text{ kJ/m}^2$). Después de 15 días de almacenamiento la capa de ceras epicuticulares de estos frutos se observó esparcida sobre la superficie de los frutos y respecto al día 10 parecería más delgada

4.3.4 Evaluación de parámetros de calidad

En las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C se midieron los siguientes factores de calidad: propiedades mecánicas, pérdida de peso y color, teniendo en cuenta la respuesta microbiológica evaluada.

4.3.4.1 Medición de las propiedades mecánicas

Las curvas Fuerza –Desplazamiento, registradas desde el instante en que la punta de acero tocó el epicarpo del fruto hasta que atravesó todo el mesocarpo del mismo, se muestran en **Figura 4-3-3**.

La **Tabla 4-25** presenta los valores medios de los parámetros mecánicos: fuerza máxima de ruptura (F_R), desplazamiento correspondiente a la F_R (D_R), trabajo (W) necesario para romper el epicarpo y la rigidez (R_i), obtenidos para las muestras FF, muestras control y las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C.

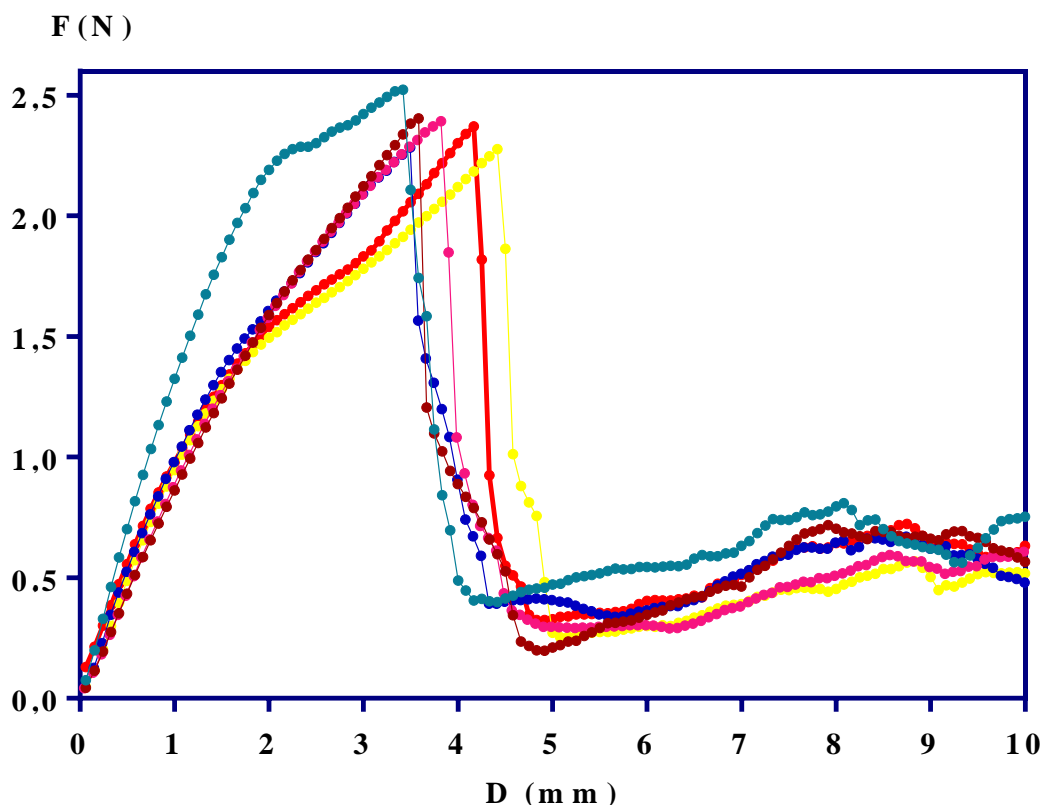


Figura 4-3-3. Curvas Fuerza vs. Desplazamiento típicas de frutos de arándanos frescos FF (●); control O₂ 10 min - 0 kJ/m² (●); tratados con ozono y/o irradiados con luz UV-C: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●), 5,3 kJ/m² (●), 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m² (●), 5,3 kJ/m² - 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (●).

El comportamiento de los parámetros mecánicos estudiados (F_R , D_R , W y R_i) fue similar entre muestras tratadas y sin tratar para un mismo día de almacenamiento. Durante el almacenamiento dichos parámetros fueron variando: en general la fuerza máxima de ruptura (F_R) y el desplazamiento (D_R) fueron aumentando y como consecuencia también el trabajo (W). La rigidez (R_i) de las muestras tratadas y sin tratar a partir del día 5 de almacenamiento presentó un pronunciado descenso en sus valores permaneciendo prácticamente constante hasta el final del almacenamiento.

Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza multivariado (MANOVA). Para cumplir con los supuestos de MANOVA los datos fueron transformados a raíz cuadrada. Previo a este análisis se evaluó el grado de asociación entre las variables estudiadas con un análisis de correlación. El trabajo (W) presentó correlación significativa ($p < 0,001$) con F_R y

D_R , por tanto esta variable fue excluida del análisis multivariado (F_R : $r = 0,88$; $r = 0,52$ y D_R : $r = 0,88$; $r = 0,51$, coeficiente de asociación lineal de Pearson y coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, respectivamente en cada caso).

El análisis estadístico señaló interacción significativa entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{15, 616} = 4,11$; $p < 0,0001$). En la **Tabla 4-25** se puede observar que para un mismo día de almacenamiento, en los días 0 y 5 de almacenamiento los frutos FF presentaron ligeras diferencias no significativas respecto al control y los frutos tratados, las mismas podrían atribuirse a la pequeña variación que se observó entre los valores de D_R y R_i de las muestras. En general, los valores de R_i correspondientes a los FF fueron ligeramente superiores, mientras que los de D_R fueron ligeramente inferiores respecto al resto de muestras. En el día 10 de almacenamiento, las muestras control ($0 \text{ kJ/m}^2\text{- O}_2 \text{ 10 min}$) se observaron significativamente diferentes (con excepción del tratamiento con luz UV-C individual) debido a que sus valores de F_R y D_R fueron más altos y los valores de R_i ligeramente más bajos, respecto al resto de muestras.

Al finalizar el almacenamiento (día 15) no se observaron diferencias significativas entre FF, control y tratados. A pesar de ello, es importante mencionar que al igual que lo descrito en el **ítem 4.2.5.2**, las muestras irradiadas con luz UV-C, ya sea como tratamiento individual o combinada con ozono, presentaron un ligero incremento en los valores de F_R respecto a las ozonizadas solamente o a los FF y control.

Al comparar solamente las muestras FF durante el almacenamiento, se puede observar que las muestras del día 5, 10 y 15 de almacenamiento fueron significativamente más deformables y menos rígidas con respecto al día 0, ya que sus valores de D_R se incrementaron y los de R_i disminuyeron, si bien los valores de la F_R se incrementaron levemente.

Por otra parte, las propiedades mecánicas de las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C y almacenadas (5, 10 y 15 días), a pesar de no mostrar diferencias significativas para un mismo día de almacenamiento, fueron significativamente diferentes a las muestras tratadas del día 0, mostrando la misma tendencia de las muestras control: menor rigidez y mayor deformabilidad y resistencia a la ruptura.

Se realizó un análisis de función discriminante (AFD), a partir del cual se obtuvo 3 funciones discriminantes (o ejes canónicos). En las **Tablas 4-26** y **4-27** se reportan los valores de los autovalores de la matriz grupos y las funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común.

Tabla 4-25. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de F_R , D_R , W y R_i de los frutos de arándano fresco y tratados con ozono y/o luz UV-C y almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	F _R (N)			D _R (mm)			W (mJ)			R _i (N/mm)			
0	FF	2,0	±	0,4	3,9	±	0,7	4,7	±	1,4	0,9	±	0,4	e
	0 kJ/m ² - O ₂ 10 min	2,1	±	0,5	4,1	±	0,8	4,7	±	1,8	0,8	±	0,3	a,b,c, e
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	2,2	±	0,4	4,4	±	0,8	5,6	±	1,5	0,8	±	0,3	b,c,d,e
	5,3 kJ/m ²	2,1	±	0,4	4,2	±	0,8	5,1	±	1,9	0,8	±	0,3	b,c,d,e
	O ₃ - UV-C	2,0	±	0,5	4,5	±	0,9	5,4	±	1,9	0,8	±	0,3	b,c,d,e
	UV-C - O ₃	2,3	±	0,5	4,1	±	0,6	5,6	±	1,8	0,9	±	0,3	b, e
5	FF	2,5	±	0,5	4,6	±	0,7	6,3	±	1,4	0,8	±	0,2	a, b,c,d, j
	0 kJ/m ² - O ₂ 10 min	2,3	±	0,7	4,7	±	0,8	5,6	±	1,9	0,5	±	0,2	g,h,i,j
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	2,1	±	0,5	4,7	±	0,8	5,7	±	2,1	0,6	±	0,2	i,j
	5,3 kJ/m ²	2,4	±	0,6	4,8	±	1,0	6,3	±	2,2	0,6	±	0,2	f,g,h,i,j
	O ₃ - UV-C	2,4	±	0,7	4,8	±	0,7	6,1	±	2,5	0,6	±	0,2	f,g,h,i,j
	UV-C - O ₃	2,4	±	0,6	4,9	±	0,7	6,5	±	1,6	0,6	±	0,2	h,i,j
10	FF	2,1	±	0,6	4,7	±	0,7	5,6	±	1,8	0,6	±	0,2	a, b,c,d,e j
	0 kJ/m ² - O ₂ 10 min	2,5	±	0,6	5,4	±	1,4	7,1	±	1,8	0,5	±	0,2	f
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	2,2	±	0,6	5,1	±	1,1	5,9	±	2,0	0,6	±	0,3	d, i,j
	5,3 kJ/m ²	2,6	±	0,7	4,8	±	0,7	6,7	±	2,0	0,7	±	0,2	f,g,h,i,j
	O ₃ - UV-C	2,2	±	0,6	5,0	±	1,0	5,8	±	2,1	0,6	±	0,3	a, c,d, i,j
	UV-C - O ₃	2,1	±	0,6	5,2	±	0,8	5,7	±	2,0	0,5	±	0,2	i,j
15	FF	2,3	±	0,5	4,8	±	0,8	5,8	±	1,6	0,6	±	0,2	f,g,h,i,j
	0 kJ/m ² - O ₂ 10 min	2,2	±	0,5	4,8	±	0,7	5,5	±	1,4	0,6	±	0,3	f,g,h,i,j
	5,1 mg O ₃ .L ⁻¹ 10 min	2,4	±	0,7	5,1	±	1,0	6,0	±	1,8	0,5	±	0,2	f,g,h,i,j
	5,3 kJ/m ²	2,8	±	0,8	4,8	±	0,8	7,2	±	2,8	0,6	±	0,2	f,g
	O ₃ - UV-C	2,5	±	0,9	5,3	±	0,9	6,5	±	2,7	0,5	±	0,2	f,g,h,i
	UV-C - O ₃	2,8	±	0,6	5,3	±	1,0	7,5	±	2,1	0,6	±	0,3	f,g,h

Los resultados fueron expresados como el promedio (n=30) ± la desviación estándar de la muestra. Los valores promedio de una misma fila identificados con igual letra minúscula no presentaron diferencias significativas (p< 0,05) entre tratamientos.

Tabla 4-26 y 4-27. Autovalores y funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común correspondientes al análisis AFD de los estimadores de los parámetros obtenidos de la curvas de fuerza-desplazamiento de arándanos frescos, control y tratados con ozono y/o luz UV- C.

Tabla 4-26

Autovalores			
Función discriminante	Valor	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	0,76	83,26	83,26
2	0,09	9,96	93,22
3	0,06	6,78	100

Tabla 4-27

Funciones discriminantes estandarizadas por la matriz de covarianza residual común			
	1	2	3
RAÍZ_FR	-1,37	-0,93	0,12
RAÍZ_DR	0,3	1,07	0,81
RAÍZ_Ri	1,54	0,52	0,93

La primera función discriminante resultante del AFD explicó el 83,26 % de la variabilidad de los datos, mientras que la segunda función discriminante explicó el 9,96 %. Ambas funciones explicaron el 93,22 % acumulado de la variabilidad total entre todos los tratamientos (**Tabla 4-26**).

En la **Tabla 4-27** puede observarse que las variables R_i y F_R en la primera función discriminante presentaron el mayor valor absoluto respectivamente y por lo tanto fueron las variables que mayor poder discriminante entre los tratamientos. En la segunda función discriminante, F_R y D_R fueron las variables con mayor aporte.

En la **Figura 4-3-4** se representa la clasificación de los tratamientos entre la primera y segunda función discriminante, así como entre la primera y tercera función discriminante. Se graficaron solamente los centroides (por razones ya explicadas anteriormente) correspondientes a cada uno de los tratamientos para visualizar mejor los resultados obtenidos en el AFD. El AFD no clasificó correctamente la mayoría de tratamientos debido a la similitud entre ellos, solamente un 13 % del total de todas las muestras ($n = 693$) fueron clasificados en sus respectivos grupos. El tratamiento mejor clasificado fue el correspondiente a las muestras irradiadas con luz UV-C correspondiente al día 15 de almacenamiento.

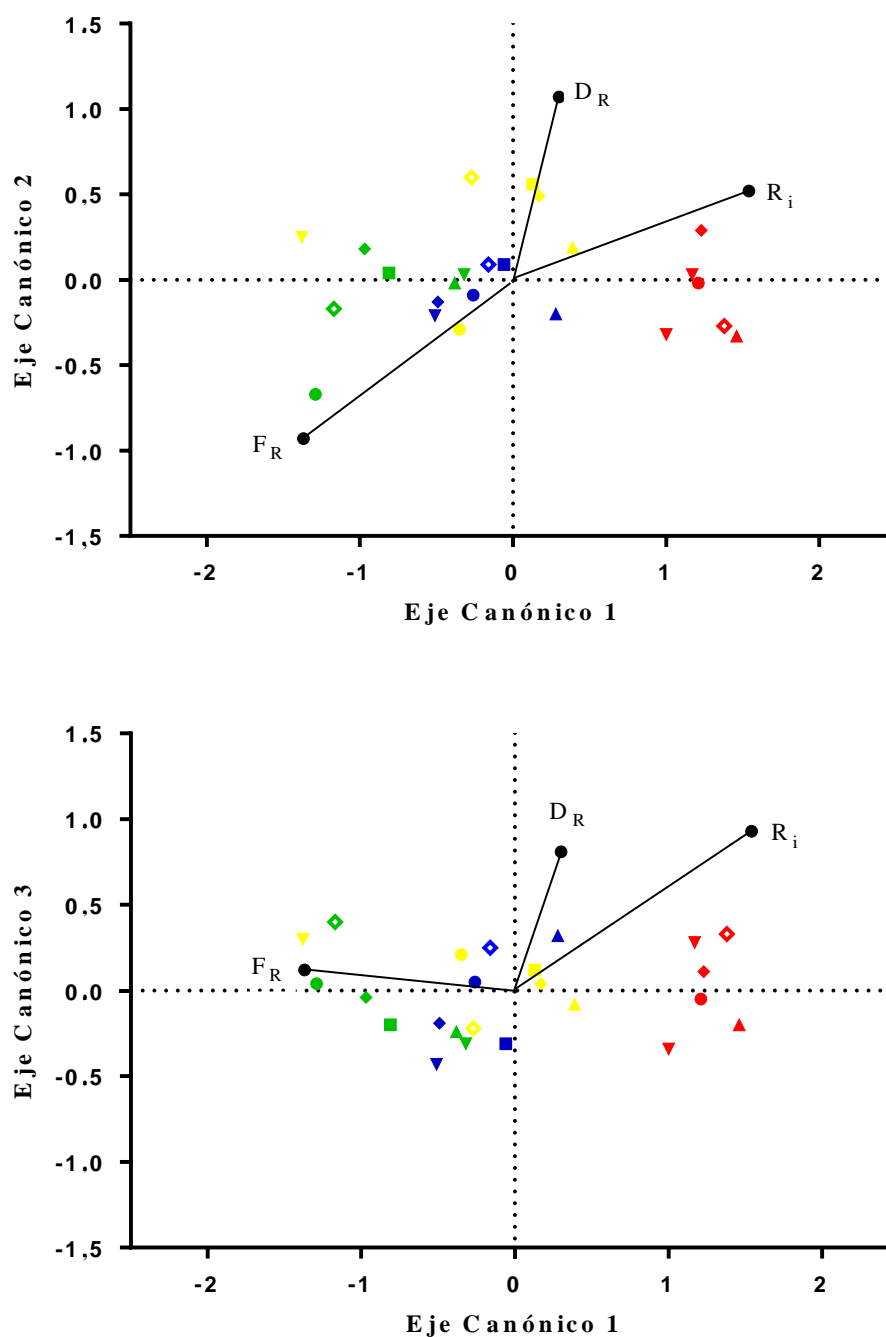


Figura 4-3-4. Centroides del análisis discriminante correspondiente a los estimadores de las propiedades mecánicas obtenidos a partir de los ensayos de punción de arándanos frescos FF (▲); control 0 kJ/m^2 - O_2 10 min (▼) y frutos tratados con ozono y/o irradiados con luz UV-C: $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min (■), $5,3 \text{ kJ/m}^2$ (●), $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min - $5,3 \text{ kJ/m}^2$ (◆), $5,3 \text{ kJ/m}^2$ - $5,1 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ 10 min (◇). Almacenados durante 0 (—), 5 (—), 10 (—) y 15 (—) días.

En concordancia con el MANOVA, en la **Figura 4-3-4**, se puede observar que los centroides correspondientes a los FF, control y tratados con ozono y/o luz UV-C correspondientes al día 0 se agruparon y se separaron de los otros días de almacenamiento. Este agrupamiento se explicaría principalmente por las variables F_R y R_i , cuyos valores en el día 0 fueron inferiores en el caso de F_R y superiores en el caso de R_i , respecto a los días 5, 10 y 15 de almacenamiento. El centroide correspondiente a las muestras FF día 0 se ubicó al extremo positivo del eje canónico 1, indicando tener los valores de R_i más altos. Debido a la disminución de los valores de R_i y el aumento de los valores de F_R durante el almacenamiento, las muestras (días 5 y 10) se fueron corriendo hacia la izquierda de este eje, hasta que finalmente todas las muestras correspondientes al día 15 de almacenamiento se ubicaron hacia el eje negativo de la función discriminante 1. Las muestras correspondientes a este último día no se agruparon del todo, los frutos ozonizados e irradiados se separaron de los FF y el control debido especialmente a la diferencia en los valores de F_R . Los frutos correspondientes al tratamiento con luz UV-C se ubicaron en el extremo negativo del eje canónico 1 y 2, indicando de esta forma que los valores más altos de F_R los obtuvieron estas muestras.

Las muestras almacenadas durante los días 5 y 10 se agruparon cerca de los valores de 0 del eje canónico 1 (excepto las muestras control, día 10), además se suman las muestras FF y control correspondiente al día 15 de almacenamiento. Como se mencionó en el análisis del MANOVA, las muestras control, día 10, presentaron valores de F_R (excepto 5,3 kJ/m²) y D_R superiores a todas las muestras.

Al observar el eje canónico 2 se puede observar que no hay prácticamente ninguna agrupación de las muestras, sí se destaca que las muestras correspondientes a los tratamientos de combinación y las ozonizadas (día 10) presentaron valores elevados de D_R y las muestras irradiadas (día 15) presentaron valores elevados de F_R .

4.3.5.2 Pérdida de peso

En la **Figura 4-3-5** se muestran los porcentajes de pérdida de peso (PP %) de los frutos frescos y los distintos tratamientos a lo largo del almacenamiento. Los frutos de arándano durante el almacenamiento mostraron una disminución de peso, tanto en las muestras FF como en las tratadas con ozono y/o luz UV-C.

El análisis estadístico realizado por GLMMs no mostró interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{8, 250} = 1,93$; $p = 0,0557$). Al contrastar los promedios de las muestras evaluadas para un mismo día, el PP (%) de las muestras tratadas con ozono y/o luz UV-C fue significativamente diferente a las muestras FF ($F_{4, 250} = 36,75$; $p < 0,0001$). El menor PP (%) se observó en los FF tanto en el día 0, así como durante el almacenamiento. No se observaron diferencias significativas en los frutos solamente ozonizados o irradiados pero se observaron diferencias significativas en el PP (%) de éstos frutos con los frutos tratados con la combinación (independientemente del sentido de los tratamientos). Entre las combinaciones, no se observaron diferencias significativas en el PP (%).

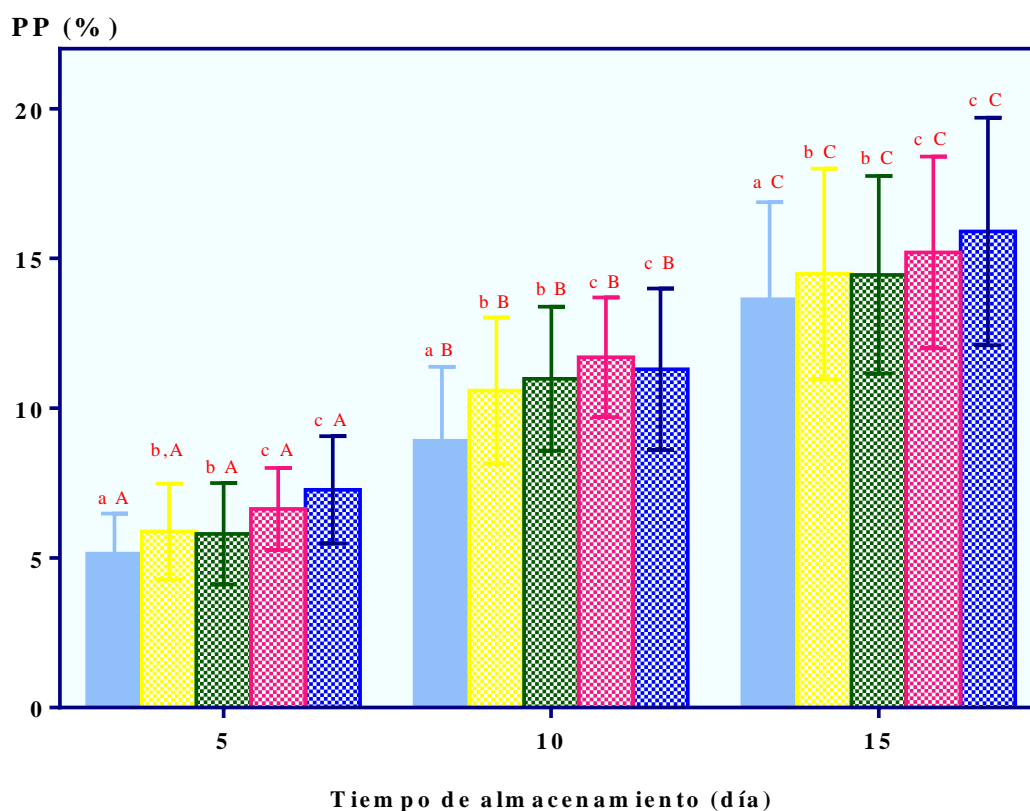


Figura 4-3-5. Valores promedios del PP (%) de arándanos frescos FF (●) y expuestos a distintos tratamientos: 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■), 5,3 kJ/m² (■), 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min - 5,3 kJ/m² (■), 5,3 kJ/m² - 5,1 mg O₃.L⁻¹ 10 min (■). Almacenados a 8 °C durante 15 días. Las barras verticales representan las desviaciones estándar. Barras identificadas con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

Para todas las muestras evaluadas el PP (%) incrementó significativamente ($F_{2, 250} = 142,98$; $p < 0,0001$) conforme aumentó el tiempo de almacenamiento (refrigeración a 8 ± 1 °C). Después

de 15 días de almacenamiento el PP (%) para los frutos FF y tratados fue de $13,6 \pm 3,3$ % (FF); $14,5 \pm 3,5$ % ($5,1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ O}_3$ 10 min); $14,5 \pm 3,3$ % ($5,3 \text{ kJ/m}^2$); $15,9 \pm 3,8$ % (O_3 - UV-C) y $15,2 \pm 3,2$ % (UV-C - O_3).

Los tratamientos que en general presentaron mayor PP (%) fueron los combinados en ambas secuencias. Es posible que esto se deba a que las células del epicarpo de estos frutos se observaron mayormente afectadas (**Lámina 4-3-II E-H**) comparadas a los FF y los frutos tratados con un solo factor (ozono o luz UV-C), como así también a la severa redistribución y alteración de las ceras epicuticulares, sometidas a un doble tratamiento (**Lámina 4-3-V E-H**).

Es importante resaltar la importancia de la temperatura en el almacenamiento, la cual se ha dicho tiene una relación directa con la pérdida de agua de los frutos. A modo comparativo ya que se trata de lotes de diferentes años, se puede observar que el PP (%) de los frutos FF descriptos en el **ítem 4.1.4.3** es muy diferente a el PP (%) de los FF descriptos en este punto. Después de 15 días de almacenamiento, el PP (%) de los frutos FF no superó el 2 % cuando éstos fueron almacenados a 4 ± 1 °C, mientras que, cuando los FF fueron almacenados a 8 ± 1 °C, el PP (%) fue de aproximadamente 6 %.

4.3.5.3 Parámetros y funciones colorimétricas

Se analizaron los cambios en el color de los frutos frescos (FF) y los tratados con ozono y/o luz UV-C, a lo largo de 15 días de almacenamiento a 8 ± 1 °C. Los valores medios de los parámetros L^* , a^* , b^* y de las funciones de color C^* y h obtenidos se muestran en la **Tabla 4-28**.

Para el análisis estadístico de cada uno de los parámetros de color se realizó una comparación de modelos lineales generales mixtos (GLMMs). El parámetro L^* y la función C^* mostraron interacción significativa entre los factores los “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” ($F_{12, 370} = 9,73$, $p < 0,0001$; $F_{12, 370} = 0,0001$, respectivamente). Por el contrario los parámetros a^* y b^* y la función h no mostraron interacción significativa entre los factores ya mencionados ($F_{12, 370} = 1,23$, $p = 0,2555$; $F_{12, 370} = 1,62$, $p = 0,0817$; $F_{12, 370} = 1,40$, $p = 0,1611$).

El parámetro L^* de las muestras irradiadas con luz UV- C y las tratadas con ozono y luz UV- C en combinación mostraron valores distintos al de las muestras FF y ozonizadas, tanto en el día 0 como durante el almacenamiento.

Tabla 4-28. Valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar de los parámetros y funciones de color de los frutos de arándano fresco (FF) y tratados con ozono y/o luz UV-C y almacenados a 8 ± 1 °C durante 15 días.

Tiempo de almacenamiento (día)	Tratamiento	L*	a*	b*	C*	h
0	FF	22,6 \pm 2,4 a	0,2 \pm 0,7 a,A	-2,4 \pm 1,2 a,A	2,5 \pm 1,2 a	274 \pm 22 a,A
	5,1 mg.L ⁻¹ O ₃ 10 min	23,2 \pm 1,4 a	0,03 \pm 0,3 a,A	-2,7 \pm 1,1 a,A	2,7 \pm 1,0 a	271 \pm 8 a,A
	5,3 kJ/m ²	17,8 \pm 1,3 e	0,1 \pm 0,5 a,A	-1,6 \pm 0,9 b,A	1,7 \pm 0,9 b	276 \pm 16 a,A
	O ₃ -UV-C	19,8 \pm 0,8 c	0,2 \pm 0,8 a,A	-1,7 \pm 0,9 b,A	1,9 \pm 0,8 b,c	278 \pm 24 a,A
	UV-C-O ₃	20,8 \pm 1,3 c,d	0,2 \pm 0,4 a,A	-1,2 \pm 0,8 b,A	1,3 \pm 0,7 b	282 \pm 23 a,A
5	FF	22,4 \pm 2,4 a	-0,01 \pm 0,2 a,A	-3,5 \pm 1,4 a,B	3,5 \pm 1,4 a	270 \pm 7 a,A
	5,1 mg.L ⁻¹ O ₃ 10 min	22,9 \pm 2,1 a	-0,03 \pm 0,3 a,A	-3,3 \pm 1,4 a,B	3,3 \pm 1,4 a	271 \pm 9 a,A
	5,3 kJ/m ²	19,9 \pm 1,3 c,e	0,1 \pm 0,4 a,A	-1,6 \pm 0,8 b,B	1,7 \pm 0,7 b	275 \pm 19 a,A
	O ₃ -UV-C	20,6 \pm 1,3 c,d	0,3 \pm 0,8 a,A	-1,7 \pm 1,1 b,B	2,0 \pm 0,9 b,c	279 \pm 31 a,A
	UV-C-O ₃	19,5 \pm 0,8 c	0,0 \pm 0,2 a,A	-1,3 \pm 0,7 b,B	1,3 \pm 0,7 b	268 \pm 17 a,A
10	FF	25,8 \pm 2,8 b	0,1 \pm 0,5 a,A	-2,8 \pm 1,1 a,A,B	2,9 \pm 1,0 a	273 \pm 15 a,A
	5,1 mg.L ⁻¹ O ₃ 10 min	23,1 \pm 2,1 a	0,0 \pm 0,4 a,A	-2,8 \pm 1,2 a,A,B	2,9 \pm 1,2 a	272 \pm 11 a,A
	5,3 kJ/m ²	19,8 \pm 1,1 c	0,2 \pm 0,9 a,A	-1,6 \pm 0,5 b,A,B	1,7 \pm 0,7 b	274 \pm 22 a,A
	O ₃ -UV-C	21,8 \pm 1,2 c,d	0,2 \pm 0,8 a,A	-1,8 \pm 0,6 b,A,B	2,0 \pm 0,6 b,c	278 \pm 24 a,A
	UV-C-O ₃	20,0 \pm 1,1 c	0,0 \pm 0,4 a,A	-1,3 \pm 0,7 b,A,B	1,4 \pm 0,6 b	268 \pm 25 a,A
15	FF	25,1 \pm 2,7 b	0,4 \pm 1,1 a,A	-2,9 \pm 1,1 a,A,B	3,2 \pm 1,1 a	279 \pm 19 a,A
	5,1 mg.L ⁻¹ O ₃ 10 min	22,9 \pm 1,9 a	0,3 \pm 0,7 a,A	-2,9 \pm 1,1 a,A,B	3,0 \pm 1,0 a	277 \pm 23 a,A
	5,3 kJ/m ²	19,4 \pm 1,0 c,e	0,2 \pm 0,7 a,A	-1,7 \pm 0,6 b,A,B	1,8 \pm 0,6 b	274 \pm 21 a,A
	O ₃ -UV-C	18,8 \pm 1,4 c,e	0,02 \pm 0,3 a,A	-1,4 \pm 0,8 b,A,B	1,4 \pm 0,8 b	272 \pm 19 a,A
	UV-C-O ₃	20,9 \pm 1,0 c,d	0,4 \pm 0,8 a,A	-1,5 \pm 0,6 b,A,B	1,8 \pm 0,6 b	285 \pm 26 a,A

Los resultados fueron expresados como el promedio (n=30) \pm la desviación estándar de la muestra.

Los valores promedio de una misma columna identificados con: igual letra minúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; igual letra mayúscula, no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días de almacenamiento.

La luminosidad en los frutos FF y ozonizados fue significativamente mayor respecto a las frutas irradiadas solamente o irradiadas y ozonizadas (independientemente del sentido de los tratamientos). La luminosidad de los FF y ozonizados en el día 0 fue al menos un 14 % superior con respecto al resto de tratamientos. La luminosidad de las muestras irradiadas y tratadas con las combinaciones permanecieron prácticamente invariables durante todo el almacenamiento. En cambio, el parámetro L^* de los FF al día 10 y 15 de almacenamiento mostró un incremento leve pero significativo.

El parámetro a^* en términos generales para todas la muestras evaluadas tomo valores positivos cercanos a 0. No se observó una tendencia clara entre los valores de este parámetro para los FF y las muestras tratadas, inclusive para un mismo tratamiento evaluado durante los 15 días. El análisis estadístico no señaló diferencias significativas entre tratamientos.

El parámetro b^* en todas las muestras analizadas presentó valores negativos, correspondientes al color azul. Los valores observados en las muestras FF y ozonizadas fueron significativamente más bajos comparados a los valores del resto de tratamientos. Durante el almacenamiento los valores de todos los tratamientos permanecieron prácticamente constantes, excepto para las muestras FF y ozonizadas en el día 5, donde se observaron valores ligeramente más bajos respecto del día 0.

Los valores del parámetro C^* obtenidos fueron bajos tanto en las muestras FF, como en las ozonizadas y/o irradiadas, lo cual denota un grado de saturación muy bajo. Las muestras irradiadas fueron significativamente menos vívidas (valores más pequeños) en relación a los FF y los frutos ozonizados.

La tonalidad del color h de los frutos de arándano fresco, control y tratados mostraron valores situados en el tono azul-rojo (ángulos de tono entre 268° y 285°). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos ensayados.

4.3.6 Aportes e integración de resultados

Existen varios estudios en los que se ha evaluado el efecto de la combinación de tecnologías de procesamiento mínimo en frutas y verduras. Sin embargo, a pesar de ser una temática que se viene estudiando con mayor frecuencia en la última década, pocos son los estudios que hay respecto al efecto de combinación de tecnologías emergentes en la descontaminación de frutas y aún menos respecto a frutos de arándano. Dependiendo de la fruta, las tecnologías combinadas y las condiciones de tratamiento, se han reportado diversos

resultados del efecto de estos tratamientos respecto al efecto antimicrobiano y calidad de las frutas.

Hasta el momento de la realización de este trabajo, los estudios en la literatura respecto a la combinación de ozono (en fase gaseosa o fase acuosa) y luz UV-C son escasos. Kim y Hung (2012) evaluaron el efecto de la combinación ozono en fase gaseosa y luz UV-C sobre *Escherichia coli* O157:H7 inoculado superficialmente en frutos de arándano. Dichos autores señalaron que la combinación de 1 min de ozonización (4000 mg.L^{-1}) seguido de 2 min de irradiación con luz UV-C ($7,95 \text{ mW/cm}^2$) logró de 1 a 2 reducciones logarítmicas más, respecto a los frutos tratados con ozono o luz UV-C independientemente. Respecto al efecto de la combinación de ozono en fase acuosa y luz UV-C en frutos de arándano, no se encontraron publicaciones en la literatura. Los efectos de la combinación de ozono o luz UV-C con otras tecnologías de procesamiento mínimo ha sido estudiada en frutilla y arándano, entre otros. Xu y col. (2016), en su estudio acerca del efecto de luz UV-C (4 kJ m^2) combinada con dióxido de cloro (2 mg.L^{-1}) en fase acuosa sobre la vida útil y calidad de frutos de arándano, señalaron que dicha combinación retardó el porcentaje de frutos infectados, disminuyó la tasa de respiración y la pérdida de peso; retardó el ablandamiento de los frutos e incrementó el contenido de antocianinas de los frutos tratados, respecto a los frutos control. Alexandre y col. (2011) evaluaron el efecto del ozono en fase acuosa (0,3 ppm; 2 min) combinado con tratamientos de escaldado (50 y 55°C ; 1 min) sobre mesófilos totales en frutillas. La combinación no tuvo efectos sinérgicos y en algunos casos las reducciones de los microorganismos evaluados fueron menores a las obtenidas cuando los tratamientos fueron aplicados de manera individual. En frutilla también se ha estudiado combinaciones de ozono y dióxido de cloro y de luz UV-C y dióxido de cloro en fase acuosa (Kim y col., 2010; Aday y Caner, 2014) entre otros.

De acuerdo a los resultados descriptos para esta sección, la combinación ozono – luz UV-C (o viceversa) en las dosis propuestas no permitieron obtener una descontaminación fúngica significativamente mejor a la obtenida cuando los frutos fueron sometidos a los tratamientos individuales. La secuencia de la combinación no influyó en los resultados obtenidos, a pesar de que se observó un porcentaje de frutos infectados por la micobiota nativa menor cuando el tratamiento se realizó en el orden ozono – luz UV-C. Aunque en las propiedades mecánicas evaluadas no se observó un mayor efecto del tratamiento, la combinación de ozono y luz UV-C afectó marcadamente la micro y ultraestructura de los frutos; se observó una fuerte compactación tangencial en el epicarpo, incremento en los EI y una notoria redistribución de la capa de ceras epicuticulares. Estos cambios fueron correlacionados con el muy alto porcentaje de pérdida de peso que se observó en los frutos tratados con la combinación



5. CONCLUSIONES

El tratamiento con **ozono** en fase acuosa en las concentraciones y tiempos de exposición estudiados permitió retardar y disminuir el desarrollo de la micobiota nativa y de *B. cinerea* en arándanos durante el almacenamiento a 4 ± 1 °C. Así mismo, el tratamiento con **luz UV-C** en las dosis estudiadas permitió retrasar el desarrollo fúngico del arándano almacenado a 8 ± 1 °C. En todos los casos, el efecto resultó independiente de la concentración y el tiempo de tratamiento.

El porcentaje de frutos infectados en arándanos frescos, controles y tratados con **ozono** o **luz UV-C** se incrementó durante el almacenamiento.

Respecto a la fruta no tratada (frutos frescos) y sus respectivos controles, los tratamientos con **ozono** independientemente del tiempo de exposición retardaron en al menos 2 (5,1 mg O₃.L⁻¹) y 4 (3,0 mg O₃.L⁻¹) días de almacenamiento el crecimiento de la micobiota nativa, excepto el tratamiento con 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 20 min en el que, el crecimiento fúngico se presentó el mismo día que en los frutos frescos. En el caso de los frutos irradiados, el tratamiento con **luz UV-C** retrasó al menos 4 días el desarrollo de la micobiota nativa respecto a los frutos frescos y el control 0 kJ/m².

Los tratamientos que en promedio presentaron los mejores resultados en el porcentaje de inhibición de *B. cinerea* luego de 15 días de almacenamiento fue 5,1 mg O₃.L⁻¹ durante 10 min para el caso del ozono y 8,3 kJ/m² en el caso de **luz UV-C**. En los frutos **ozonizados** se retrasó en al menos 1 día el desarrollo de *B. cinerea* respecto a los frutos frescos (inoculados superficialmente) y sus respectivos controles, mientras que en los frutos **irradiados** la demora fue al menos de 2 días.

El tratamiento con **ozono** en fase acuosa produjo cambios microestructurales (degradación y disrupciones en la pared tangencial externa y paredes celulares de la epidermis, incremento en los espacios de las capas del epicarpo), los cuales se fueron acentuando conforme aumentó el tiempo de exposición y el período de almacenamiento. El tratamiento con **luz UV-C** produjo modificaciones similares a las ya mencionadas pero en menor proporción que el ozono.

El tratamiento con **ozono** en general erosionó el espesor de la capa de ceras epicuticulares. En ninguno de los tratamientos con ozono se observaron zonas absolutamente lisas que indicaran la ausencia total de ceras epicuticulares. Durante el almacenamiento las muestras ozonizadas presentaron una redistribución y una reducción del espesor de la capa de ceras. En lo que se refiere al tratamiento con **luz UV-C**, las ceras epicuticulares mostraron una redistribución sobre la superficie de los frutos, observándose cristales más grandes respecto al

control. Así mismo se observó una capa de ceras menos densa en los frutos irradiados, comparada a la de los frutos frescos.

Los tratamientos con **ozono** o **luz UV-C** ensayados no afectaron el pH, la acidez titulable, el contenido de sólidos solubles y la humedad de los frutos de arándano tratados respecto a los frutos frescos.

Los tratamientos con **ozono** y **luz UV-C** en las dosis estudiadas no mostraron un efecto negativo en los parámetros mecánicos mencionados de los frutos tratados respecto a los frutos frescos. Se observó una disminución en la fuerza necesaria para atravesar la subepidermis y mesocarpo de los frutos ozonizados respecto al control, lo cual se correlacionó con lo observado en las fotomicrografías de microscopía óptica. Se produjo una mejora en los valores de fuerza máxima de ruptura (F_R) en los frutos irradiados con **luz UV-C** al día 15 de almacenamiento.

El porcentaje de pérdida de peso de los frutos **ozonizados** resultó dosis-dependiente, siendo mayor para las dosis más altas. Así mismo, el porcentaje de pérdida de peso de los frutos tratados con **luz UV-C** resultó significativamente mayor a los frutos frescos, lo cual fue atribuido a la cantidad de ceras removidas durante el mecanismo de agitación para irradiar los frutos.

Los tratamientos con **ozono** ensayados no produjeron alteraciones mayores en el color de los frutos tratados. Por el contrario, resultados disimiles se observaron en las muestras tratadas con **luz UV-C**, donde los frutos tratados mostraron un color significativamente diferente a los frutos frescos. Los parámetros mayormente afectados fueron L^* y b^* , lo cual fue asociado con la remoción de las ceras de los frutos durante los tratamientos.

Se observó un incremento significativo en los compuestos bioactivos (antocianinas, fenoles totales) y la capacidad antioxidante de los frutos **ozonizados** respecto al control. El contenido de antocianinas y fenoles permaneció prácticamente invariable durante los 10 primeros días de almacenamiento, sin embargo después de 15 días de almacenamiento disminuyeron en todas las muestras. La capacidad antioxidante no presentó diferencias durante el almacenamiento. En los frutos irradiados con **luz UV-C**, los valores del contenido de antocianinas y fenoles totales y la capacidad antioxidante de los frutos tratados no presentaron

diferencias significativas respecto a los frutos frescos. Durante el almacenamiento, el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante aumentaron en todos los casos.

El **tratamiento combinado** con ozono y luz UV-C en las dosis estudiadas independientemente de la secuencia en la que fueron aplicados, permitió retardar el desarrollo de micobiota nativa y *B. cinerea* en arándanos durante el almacenamiento a 8 ± 1 °C.

Sin embargo, este estudio mostró que las combinaciones no permitieron alcanzar mejores resultados a los obtenidos con los tratamientos individuales, respecto al porcentaje del desarrollo fúngico en los frutos de arándano.

En relación a los frutos frescos, los tratamientos combinados no retardaron la aparición de la infección por la micobiota nativa pero sí disminuyeron su desarrollo. Sin embargo, en lo que se refiere a *B. cinerea* se observó que los frutos tratados con las combinaciones propuestas retardaron 2 días el desarrollo fúngico.

Estos tratamientos en combinación produjeron cambios microestructurales mucho más drásticos que los observados con los tratamientos individuales. Se detectaron fuertes compactaciones tangenciales en el epicarpo y disrupciones en la PTE y la pared celular. Hubo un gran incremento en los espacios intercelulares. Durante el almacenamiento dichos cambios se fueron acentuando.

El tratamiento combinado con ozono y luz UV-C erosionó y redistribuyó el espesor de la capa de ceras epicuticulares de los frutos de arándano. Se observaron algunas zonas muy laxas y otras con ausencia de las mismas.

No se observaron cambios negativos en las propiedades mecánicas de los frutos tratados con las combinaciones respecto a los frutos frescos o a los frutos tratados con los tratamientos individuales. Se produjo una mejora no significativa en los valores de fuerza máxima de ruptura (F_R) en los frutos irradiados solamente o en sus combinaciones.

El porcentaje de pérdida de peso resultó significativamente más alto en los frutos tratados en combinación con ozono y luz UV-C, respecto a los frutos frescos, irradiados u ozonizados. El PP (%) se incrementó durante el almacenamiento.

El color de los frutos tratados con las combinaciones fue significativamente diferente al de los frutos frescos y ozonizados. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos combinados y los irradiados solamente.

Tanto el tratamiento con ozono en fase acuosa como la irradiación con luz UV-C y la posterior refrigeración, podrían utilizarse como estrategias de conservación alternativas para extender la vida poscosecha de los frutos de arándano, sin afectar en gran medida sus propiedades ópticas y mecánicas. En tanto que la combinación de estos factores en las condiciones evaluadas no presentaron un efecto sinérgico o aditivo en la descontaminación de los arándanos y además provocaron cambios no deseables en algunos parámetros de calidad de los frutos.

Sin embargo, se debe tener algunas consideraciones tanto en la dosis de tratamiento a utilizar, así como en las formas para agitar los frutos, de tal forma que no se afecten ciertas propiedades como el color y el contenido de ceras. Estas últimas no solo actúan como una barrera para impedir el desarrollo microbiano y evitar la deshidratación de los frutos; sino también, constituyen un parámetro de calidad importante que determina la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.



6. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, J. A. (1999). "Quality measurement of fruits and vegetables". *Postharvest biology and technology* **15**(3): 207-225.

ABC, Argentineas Blueberry Committe "Estadísticas. Hectareas por región [en línea]: <https://www.argblueberry.com/home/estadisticas/>." Ingreso: 14 Dic, 2018.

Aday, M., Büyükcan, M., Temizkan, R. y Caner, C. (2014). "Role of ozone concentrations and exposure times in extending shelf life of strawberry". *Ozone: Science y Engineering* **36**(1): 43-56.

Aday, M. S. y Caner, C. (2014). "Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life". *LWT - Food Science and Technology* **57**(1): 344-351.

Alexandre, E. M. C., Brandão, T. R. S. y Silva, C. L. M. (2012). "Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries". *Journal of Food Engineering* **108**(3): 417-426.

Alexandre, E. M. C., Santos-Pedro, D. M., Brandão, T. R. S. y Silva, C. L. M. (2011). "Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress". *Journal of Food Engineering* **105**(2): 277-282.

Ali, A., Ong, M. K. y Forney, C. F. (2014). "Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage". *Food Chemistry* **142**: 19-26.

Alzamora, S., Tapia, M. S. y López-Malo, F. (2000). Overview. En: Alzamora S.M., Tapia M.S. y López-Malo A. (Eds), *Minimally Processed Fruits and Vegetables*. Maryland, EEUU: Aspen Publishers Inc.: 1-9.

Alzamora, S. M., Viollaz, P. E., Martínez, V. Y., Nieto, A. B. y Salvatori, D. (2008). Exploring the linear viscoelastic properties structure relationship in processed fruit tissues. En: Gutiérrez-López, G. F., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J., Parada-Arias, E. (Eds), *Food Engineering: Integrated Approaches*. New York, EEUU: Springer New York. **Cap. 9**: 155-181.

- Allende, A., Marín, A., Buendía, B., Tomás-Barberán, F. y Gil, M. I. (2007). "Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries". *Postharvest Biology and Technology* **46**(3): 201-211.
- Andrade-Cuvi, M. J., Moreno, C., Zaro, M. J., Vicente, A. R. y Concellón, A. (2017). "Improvement of the antioxidant properties and postharvest life of three exotic andean fruits by UV-C treatment". *Journal of Food Quality* **2017**(4278795): 1-10.
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martín, S. E., Domínguez-Domínguez, J. y García-Almendárez, B. E. (2012). "Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity". *Food Control* **24**(1): 116-122.
- Arosha, L. y Ruplal, C. (2018). "Postharvest ultraviolet light treatment of fresh berries for improving quality and safety". *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering* **8**(3): 60-71.
- Bader, H. y Hoigné, J. (1982). "Determination of ozone in water by the indigo method: a submitted standard method". *Ozone: Science and Engineering* **4**(4): 169-176.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson educación.
- Badui, D. S. (2012). *La ciencia de los alimentos en la práctica*. México: Pearson.
- Baker, E. A. y Hunt, G. M. (1981). "Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration". *New Phytologist* **88**(4): 731-747.
- Barba, F., Esteve, M. y Frigola, A. (2013). "Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing". *Food Research International* **50**(2): 545-549.
- Barka, E., Kalantari, S., Makhoul, J. y Arul, J. (2000). "Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(3): 667-671.
- Barrett, D. M., Beaulieu, J. C. y Shewfelt, R. (2010). "Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory

measurement, and the effects of processing ". Critical Reviews in Food Science and Nutrition **50**(5): 369-389.

Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I. y Wilhelmi, H. (1998). "Classification and terminology of plant epicuticular waxes". Botanical Journal of the Linnean Society **126**(3): 237-260.

Bataller-Venta, M., Santa Cruz-Broche, S. y García-Pérez, M. (2010). "El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas". Revista CENIC. Ciencias Biológicas **41**(3): 155-164.

Beltrán, D., Selma, M. V., Marín, A. y Gil, M. I. (2005). "Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(14): 5654-5663.

Benezzer-Benezzer, M., Castro-Mercado, E. y García-Pineda, E. (2008). "La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas". Revista Mexicana de Fitopatología **26**(1): 56-61.

Bialka, K. L. y Demirci, A. (2007). "Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-Light". Journal of Food Science **72**(9): M391-M396.

Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R. (2000). "Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review". Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(6): 637-645.

Boivin, D., Blanchete, M., Barrette, S., Moghrabi, A. y Béliveau, r. (2007). "Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice". Anticancer Research **27**(2): 937-948.

Bolton, J. R. (2001). Ultraviolet Applications Handbook. Ayr, Ontario, Canada: Photosciences Incorporated **18**.

Bolton, J. R. y Linden, K. G. (2003). "Standardization of methods for fluence (UV-dose) determination in bench-scale UV experiments". Journal of Environmental Engineering **129**(3): 209-215.

- Booker, F. L. y Miller, J. E. (1998). "Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone". *Journal of Experimental Botany* **49**(324): 1191-1202.
- Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. San Diego California: Academic Press. Elsevier.
- Bowling, B. L. (2000). *The berry grower's companion*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Brazelton, C. (2016). "World blueberry acreage y production: SE Fruit and Veg 2016.". US High Bush Blueberry Council. [en línea] :<http://dev.manicmoosemedia.com/SERegional/wp-content/uploads/4.-Cort-Brazelton-World-Blueberry-Acreage-and-Production-2016.pdf> (acceso 13 Dic 2018).
- Brodowska, A. J., Nowak, A. y Śmigielski, K. (2018). "Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**(13): 2176-2201.
- Brummell, D. A. y Harpster, M. H. (2001). "Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants". *Plant Molecular Biology* **47**(1): 311-339.
- Buzeta, P. (1997). "Chile: Berries para el 2000". Departamento Agroindustrial : Fundación Chile: 1^{ra} ed. 133 pág.
- Camps, C., Guillermin, P., Mauget, J. C. y Bertrand, D. (2005). "Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits". *Journal of Texture Studies* **36**(4): 387-401.
- Concha-Meyer, A., Eifert, J. D., Williams, R. C., Marcy, J. E. y Welbaum, G. E. (2015). "Shelf life determination of fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*) stored under controlled atmosphere and ozone". *International Journal of Food Science* **2015**: 9.
- Contigiani, E. V., Jaramillo-Sánchez, G., Castro, M. A., Gómez, P. L. y Alzamora, S. M. (2018). "Postharvest quality of strawberry fruit (*Fragaria x Ananassa* Duch cv. Albion) as affected by ozone washing: fungal spoilage, mechanical properties, and structure". *Food and Bioprocess Technology* **11**(9): 1639–1650.

- Cote, S., Rodoni, L., Miceli, E., Concellón, A., Civello, P. M. y Vicente, A. R. (2013). "Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments". *Postharvest Biology and Technology* **83**: 83-89.
- Crisosto, C., Retzlaff, W., William, L., DeJong, T. y Zoffoli, J. (1993). "Postharvest performance evaluation of plum (*Prunus salicina* Lindel., Casselman') fruit grown under three ozone concentrations". *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**(4): 497-502.
- Crowe, K. M., Bushway, A. y Davis-Dentici, K. (2012). "Impact of postharvest treatments, chlorine and ozone, coupled with low-temperature frozen storage on the antimicrobial quality of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium*)". *LWT - Food Science and Technology* **47**(1): 213-215.
- Cullen, P. J., Valdramidis, V. P., Tiwari, B. K., Patil, S., Bourke, P. y O'Donnell, C. P. (2010). "Ozone processing for food preservation: An overview on fruit juice treatments". *Ozone: Science and Engineering* **32**(3): 166-179.
- Charles, M. T., Tano, K., Asselin, A. y Arul, J. (2009). "Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins". *Postharvest Biology and Technology* **51**(3): 414-424.
- Chu, W., Gao, H., Chen, H., Fang, X. y Zheng, Y. (2018). "Effects of cuticular wax on the postharvest quality of blueberry fruit". *Food Chemistry* **239**: 68-74.
- Chun, H. H., Kang, J. H. y Song, K. B. (2013). "Effects of aqueous chlorine dioxide treatment and cold storage on microbial growth and quality of blueberries". *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **56**(3): 309-315.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. y Bartolomé, B. (2004). "Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(1): 48-54.
- Davies, L. M. y Harris, P. J. (2003). "Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls". *Planta* **217**(2): 283-289

Dickson, Law, S. E., Kays, S. y Eiteman, M. (1992). "Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables". American Society of Agricultural Engineers. Meeting (USA) **92-6571**: 8

Duan, J., Wu, R., Strik, B. C. y Zhao, Y. (2011). "Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions". Postharvest Biology and Technology **59**(1): 71-79.

Duarte-Molina, F., Gómez, P. L., Castro, M. A. y Alzamora, S. M. (2016). "Storage quality of strawberry fruit treated by pulsed light: Fungal decay, water loss and mechanical properties". Innovative Food Science and Emerging Technologies **34**: 267-274.

Duffy, K. B., Spangler, E. L., Devan, B. D., Guo, Z., Bowker, J. L., Janas, A. M., Hagepanos, A., Minor, R. K., DeCabo, R., Mouton, P. R., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. A. y Ingram, D. K. (2008). "A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats". Neurobiology of Aging **29**(11): 1680-1689.

El Ghaouth, A., Wilson, C. L. y Callahan, A. M. (2003). "Induction of chitinase, β -1,3-Glucanase, and Phenylalanine Ammonia Lyase in peach fruit by UV-C treatment". Phytopathology **93**(3): 349-355.

Fahn, A. (1982). Anatomía Vegetal. Madrid, España, : Píramide Ilustraciones.

Fan, X., Huang, R. y Chen, H. (2017). "Application of ultraviolet C technology for surface decontamination of fresh produce". Trends in Food Science and Technology **70**: 9-19.

Fava, J. (2012). Anatomía aplicada al diseño de tecnologías de procesamiento mínimo en frutos (bayas) de *Vaccinium corymbosum* L.(Ericaceae), *Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme (Solanaceae) y *Vitis labrusca* L.(Vitaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Fava, J., Alzamora, S. M. y Castro, M. A. (2006). "Structure and nanostructure of the outer tangential epidermal cell wall in *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) fruits by blanching, freezing-thawing and ultrasound". Food Science and Technology International **12**(3): 241-251.

Fava, J., Hodara, K., Nieto, A., Guerrero, S., Alzamora, S. M. y Castro, M. A. (2011). "Structure (micro, ultra, nano), color and mechanical properties of *Vitis labrusca* L. (grape berry) fruits treated by hydrogen peroxide, UV-C irradiation and ultrasound". Food Research International **44**(9): 2938-2948.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Analytical Bacteriological Manual (2001). FDA.editions.

Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J. L. y Ippolito, A. (2016). "Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest". Postharvest Biology and Technology **122**: 53-69.

Figuerola, D., Guerrero, J. y Bensch, E. (2010). "Efecto de momento de cosecha y permanencia en el huerto sobre la calidad en poscosecha de arándano alto (*Vaccinium Corymbosum* L), cvs. Berkeley, Brigitta y Elliott durante la temporada 2005-2006". Idesia (Arica) **28**(1): 79-84.

Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y. y Itoh, T. (2000). "Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl". Plant and Cell Physiology **41**(4): 486-494.

Gabriel, A. A. (2015). "Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple and orange juices". Food Control **50**: 722-728.

Garcia da Rocha Concenço, I. F., Stringheta, P., Ramos, A. y Terayama Oliveira, I. (2014). "Blueberry: functional traits and obtention of bioactive compounds". American Journal of Plant Sciences **5**(18): 2633-2645.

García Rubio, J. C. y de Lena, G. (2011). El cultivo del arándano en Asturias. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino - España, Servicio regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.

Giongo, L., Grisenti, M., Khomenko, I., Poncetta, P., Loretto, P., Ajelli, M., Biasioli, F. y Farneti, B. (2017). "Fruit quality profiling of blueberries for parental choice in breeding: aroma and texture at harvest and in postharvest". *International Society for Horticultural Science (ISHS)* **1180**: 197-204.

Giongo, L., Poncetta, P., Loretto, P. y Costa, F. (2013). "Texture profiling of blueberries (*Vaccinium* spp.) during fruit development, ripening and storage". *Postharvest Biology and Technology* **76**: 34-39.

Giovanelli, G. y Buratti, S. (2009). "Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties". *Food Chemistry* **112**(4): 903-908.

Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). "Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy". *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **00**(1): F1.2.1-F1.2.13.

Glowacz, M., Colgan, R. y Rees, D. (2015). "The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce". *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**(4): 662-671.

Gómez-López, V. M., Koutchma, T. y Linden, K. (2012). Ultraviolet and pulsed light processing of fluid foods. En: Cullen, P. J., Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P. (Eds), *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. San Diego: Academic Press. **Cap. 8**: 185-223.

Gómez, P., Alzamora, S., Castro, M. A. y Salvatori, D. M. (2010). "Effect of ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: Microorganism, color and compression behavior". *Journal of Food Engineering* **98**(1): 60-70.

Gómez, P. L. (2010). *Procesamiento mínimo de manzana: efecto de la radiación UV-C y la luz pulsada de alta intensidad sobre la calidad*, Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- González-Barrio, R., Salmenkallio-Marttila, M., Tomás-Barberán, F. A., Cantos, E. y Espín, J. C. (2005). "Etiology of UV-C-induced browning in var. superior white table grapes". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(15): 5990-5996.
- Goodburn, C. y Wallace, C. A. (2013). "The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review". *Food Control* **32**(2): 418-427.
- Gordo, M. (2008). "Guía práctica para el cultivo de arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires [en línea]: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-mg_0801.pdf".
- Greco, M., Patriarca, A., Terminiello, L., Fernández Pinto, V. y Pose, G. (2012). "Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries". *International Journal of Food Microbiology* **154**(3): 187-191.
- Guerrero-Beltrán, J. A. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). "Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light". *Food Science and Technology International* **10**(3): 137-147.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. y Seydim, A. C. (2004). "Use of ozone in the food industry". *LWT - Food Science and Technology* **37**(4): 453-460.
- Heredia, A. (2003). "Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1620**(1): 1-7.
- Horvitz, S. y Cantalejo, M. J. (2012). "Effects of ozone and chlorine postharvest treatments on quality of fresh-cut red bell peppers". *International Journal of Food Science y Technology* **47**(9): 1935-1943.
- Horvitz, S. y Cantalejo, M. J. (2014). "Application of Ozone for the Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**(3): 312-339.
- Howard Luke, R., Clark John, R. y Brownmiller, C. (2003). "Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season". *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**(12): 1238-1247.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. y Prior, R. L. (2002). "High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid

handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(16): 4437-4444.

Hutchings, J. B. (2003). Expectations and the food industry: the impact of color and appearance: 1-30.

Iizuka, M. y Gebreyesus, M. (2018). "'Discovery' of non-traditional agricultural exports in Latin America: diverging pathways through learning and innovation". *Innovation and Development* **8**(1): 59-78.

Jackman, R. L. y Stanley, D. W. (1995). "Perspectives in the textural evaluation of plant foods". *Trends in Food Science and Technology* **6**(6): 187-194.

Janisiewicz, W. J., Takeda, F., Glenn, D. M., Camp, M. J. y Jurick, W. M. (2015). "Dark period following UV-C treatment enhances killing of *Botrytis cinerea* conidia and controls gray mold of strawberries". *Postharvest Pathology and Mycotoxins* **106**(4): 386-394.

Järvinen, R., Kaimainen, M. y Kallio, H. (2010). "Cutin composition of selected northern berries and seeds". *Food Chemistry* **122**(1): 137-144.

Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H. y Knox, J. P. (2003). "Intercellular adhesion and cell separation in plants". *Plant, Cell and Environment* **26**(7): 977-989.

Jeffree, C. E. (2006). The fine structure of the plant cuticle. En: Riederer M., Muller C. (Eds.), *Biology of the plant cuticle*. Germany: Blackwell Publishing. **Cap. 2**: 11-125.

Jiang, T., Jahangir, M. M., Jiang, Z., Lu, X. y Ying, T. (2010). "Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage". *Postharvest Biology and Technology* **56**(3): 209-215.

Kader, A. A. (2002). Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. En: Lamikanra O. (Ed.), *Fresh-cut Fruits and Vegetables*. Science, Technology and Market. Florida, EEUU: Boca Raton, CRC Press, : 12-19.

- Kalt, W., Joseph, J. A. y Shukitt-Hale, B. (2007). "Blueberries and human health: a review of current reseach". *Journal of the American Pomological Society* **61**(3): 151.
- Karaca, H. y Velioglu, Y. S. (2007). "Ozone applications in fruit and vegetable processing". *Food Reviews International* **23**(1): 91-106.
- Keklik, N. M., Krishnamurthy, K. y Demirci, A. (2012). Microbial decontamination of food by ultraviolet (UV) and pulsed UV light. En: Demirci, A., Ngadi, M. O. (Eds.), *Microbial Decontamination in the Food Industry*. Inglaterra: Woodhead Publishing. **Cap.12**: 344-369.
- Kerstiens, G. (1996). "Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationships". *Trends in Plant Science* **1**(4): 125-129.
- Khademi, O., Zamani, Z., Poor Ahmadi, E. y Kalantari, S. (2013). "Effect of UV-C radiation on postharvest physiology of persimmon fruit (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. 'Karajr' during storage at cold temperature". *International Food Research Journal* **20**(1): 247-253.
- Kim, C. y Hung, Y. (2012). "Inactivation of *E. coli* O157:H7 on blueberries by electrolyzed water, ultraviolet light, and ozone". *Journal of Food Science* **77**(4): M206-M211.
- Kim, J.-G., Yousef, A. E. y Khadre, M. A. (2003). Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*: Academic Press: 167-218.
- Kim, J., Kim, H., Lim, G., Jang, S. y Song, K. (2010). "The effects of aqueous chlorine dioxide or fumaric acid treatment combined with UV-C on postharvest quality of 'Maehyang' strawberries". *Postharvest Biology and Technology* **56**(3): 254-256.
- Kirby, A. R., Gunning, A. P., Waldron, K. W., Morris, V. J. y Ng, A. (1996). "Visualization of plant cell walls by atomic force microscopy". *Biophysical Journal* **70**(3): 1138-1143.
- Lara, I., Belge, B. y Goulao, L. F. (2014). "The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality". *Postharvest Biology and Technology* **87**: 103-112.
- Li, D., Luo, Z., Mou, W., Wang, Y., Ying, T. y Mao, L. (2014). "ABA and UV-C effects on quality, antioxidant capacity and anthocyanin contents of strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.)". *Postharvest Biology and Technology* **90**: 56-62.

- Li, F., Chen, G., Zhang, B. y Fu, X. (2017). "Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents". *Food Research International* **100**: 19-30.
- Li, X. y Farid, M. (2016). "A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies". *Journal of Food Engineering* **182**: 33-45.
- Lyshede, O. B. (1982). "Structure of the outer epidermal wall in xerophytes". En: Cutler, D. F., Alvin, K. L., Price, C. E. (Eds.). *The plant cuticle*. Academic Press: London: 87-98.
- Maharaj, R., Arul, J. y Nadeau, P. (1999). "Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence". *Postharvest Biology and Technology* **15**(1): 13-23.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T. y Holub, B. J. (2002). "Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(26): 7731-7737.
- Mehra, L. K., MacLean, D. D., Shewfelt, R. L., Smith, K. C. y Scherm, H. (2013). "Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit". *Postharvest Biology and Technology* **85**: 109-115.
- Meireles, A., Giaouris, E. y Simões, M. (2016). "Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry". *Food Research International* **82**: 71-85.
- Mengiste, T., Laluk, K. y AbuQamar, S. (2010). Mechanisms of induced resistance against *B. cinerea*. En: Prusky, D., Gullino, M. (Eds.), *Postharvest Pathology*. Dordrecht: Springer Netherlands. **Cap. 2**: 13-30.
- Michalska, A. y Łysiak, G. (2015). "Bioactive compounds of blueberries: post-harvest factors influencing the nutritional value of products". *International journal of molecular sciences* **16**(8): 18642-18663.
- Ministerio de Agroindustria (2018). *Cadena de Arándanos- Resumen*. Argentina: 1-7.

- Moggia, C., Graell, J., Lara, I., Schmeda-Hirschmann, G., Thomas-Valdés, S. y Lobos, G. A. (2016). "Fruit characteristics and cuticle triterpenes as related to postharvest quality of highbush blueberries". *Scientia Horticulturae* **211**: 449-457.
- Molina, N., Taiariol, D., Delssin, E. y Serial, C. (2010). "Proyecto Regional Hortícola. Proyecto Regional Alternativas Productivas. Producción de Arándanos en Corrientes. Análisis técnico y económico. INTA-EEA Bella Vista". Publicación Técnica N° 38. <http://www.inta.gov.ar/bellavista/info/documentos/otros/ST38.pdf>.
- Moreno, C., Andrade-Cuvi, M. J., Zaro, M. J., Darre, M., Vicente, A. R. y Concellón, A. (2017). "Short UV-C treatment prevents browning and extends the shelf-life of fresh-cut carambola". *Journal of Food Quality* **2017**(2548791): 1-9.
- Mosqueda, M. y Czyhrinciw, N. (1964). "Principales propiedades físicas de algunas frutas tropicales". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **14**(1): 91-102.
- MuAoz, S. y Moreira, M. (2002) "Arándanos: situación actual y perspectivas de negocio. [En línea]: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/13707>."
- Munitz, M. S. (2013). Arándanos: micoflora contaminante, micotoxinas, residuos de fungicidas y cinéticas de degradación, Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Muthukumarappan, K., Tiwari, B., O'Donnell, C. P. y Cullen, P. (2016). Ozone and CO₂ processing: Rheological and functional properties of food. En: Ahmed, J., Ramaswamy, H., Kasapis, S., Boye, J. (Eds), *Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties*. New York, EE.UU: CRC/ Press, Taylor y Francis Group. **Cap. 9**: 127-146.
- Ngadi, M. O., Bajwa, S. S. y Alakali, J. (2012). Minimally Processed Foods. En: Simpson, B.K., Nollet, L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y.H. (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing*. United Kingdom: Willey-Blackwell. **Cap. 39**: 746-763.
- Nguyen, C. T. T., Kim, J., Yoo, K. S., Lim, S. y Lee, E. J. (2014). "Effect of prestorage UV-A, -B, and -C radiation on fruit quality and anthocyanin of 'duke' blueberries during cold storage". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(50): 12144-12151.

- Nigro, F., Ippolito, A. y Lima, G. (1998). "Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes". *Postharvest Biology and Technology* **13**(3): 171-181.
- Novelli, D. (2018). "Alimentos: el consumo responsable trastoca paradigmas". *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. **44**(1): 4-9.
- Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O. y Stoia, M. (2013). "Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars". *Acta Chimica Slovenica* **60**(2): 383-389.
- Onopiuk, A., Półtorak, A., Moczowska, M., Szpicer, A. y Wierzbicka, A. (2017). "The impact of ozone on health-promoting, microbiological, and colour properties of *Rubus idaeus* raspberries". *CyTA - Journal of Food* **15**(4): 563-573.
- Palou, L. s., Crisosto, C. H., Smilanick, J. L., Adaskaveg, J. E. y Zoffoli, J. P. (2002). "Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage". *Postharvest Biology and Technology* **24**(1): 39-48.
- Pangloli, P. y Hung, Y.-C. (2013). "Reducing microbiological safety risk on blueberries through innovative washing technologies". *Food Control* **32**(2): 621-625.
- Pascual, A., Llorca, I. y Canut, A. (2007). "Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities". *Trends in Food Science and Technology* **18**: S29-S35.
- Patil, S. y Bourke, P. (2012). *Ozone Processing of Fluid Foods*. En: Cullen, P. J., Tiwari, Brijesh K., Valdramidis, Vasilis P. (Eds.), *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. San Diego: Academic Press. **Cap. 9** 225-261.
- Percy, K., McQuattie, C. y Rebbeck, J. (1994). Effects of air pollutants on epicuticular wax chemical composition. En: Percy K.E., Cape J.N., Jagels R., Simpson C.J. (Eds), *Air Pollutants and the Leaf Cuticle*. NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences). Berlin: Springer: 67-79.

- Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R. y Olías, J. M. (1999). "Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(4): 1652-1656.
- Perez, D. y Mazzone, L. (2006). *Arándano: mercados internacionales, comercio argentino, aspectos económicos y productivos del cultivo en Tucumán, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán (Argentina)*.
- Perez, E., Blanco, O., Aalves, P., Roman, A., Rodriguez, A. y Heredia, A. M. (2014). *Guía para la identificación de patógenos de poscosecha en frutos de arándanos*. Montevideo: INIA: 38 p.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J. K. y Howard, L. (2008). "Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation". *Postharvest Biology and Technology* **47**(3): 280-285.
- Perry, J. J. y Yousef, A. E. (2011). "Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques". *Annual Review of Food Science and Technology* **2**(1): 281-298.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rodrigues, D., da Cruz, P. N., Hermosín-Gutiérrez, I., Smith, R. y Godoy, H. T. (2014). "Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries". *Food Chemistry* **164**: 81-88.
- Piechowiak, T., Antos, P., Józefczyk, R., Kosowski, P., Skrobacz, K. y Balawejder, M. (2018). "Impact of ozonation process on the microbiological contamination and antioxidant capacity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit during cold storage". *Ozone: Science y Engineering*: 1-10.
- Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M. y Silva, C. L. M. (2015). "Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac) shelf-life". *Journal of Food Science and Technology* **52**(8): 5066-5074.
- Pombo, M. A., Dotto, M. C., Martínez, G. A. y Civello, P. M. (2009). "UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation". *Postharvest Biology and Technology* **51**(2): 141-148.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. y Mainland, C. M. (1998). "Antioxidant capacity as influenced by

total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species". Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(7): 2686-2693.

Qiang, Z., Demirkol, O., Ercal, N. y Adams, C. (2005). "Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in vegetables". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(25): 9830-9840.

Quintão-Teixeira, L., Soliva-Fortuny, R., Mota Ramos, A. y Martín-Belloso, O. (2013). "Kinetics of peroxidase inactivation in carrot juice treated with Pulsed Electric Fields". Journal of Food Science **78**(2): E222-E228.

Rakness, K., Gordon, G., Langlais, B., Masschelein, W., Matsumoto, N., Richard, Y., Robson, C. M. y Somiya, I. (1996). "Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator". Ozone: Science and Engineering **18**(3): 209-229.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". Free Radical Biology and Medicine **26**(9-10): 1231-1237.

Reina, J. J. y Borraz, Y. (1997). "Ceras epicuticulares en el reino vegetal: Química, ultraestructura y aspectos evolutivos". Encuentros en la Biología **Nº. 43**.

Retamales, J. B. y Hancock, J. F. (2018). Blueberry Taxonomy and Breeding Blueberries. UK: Cabi. **2**: 19-50.

Rios de Souza, V., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R. y Queiroz, F. (2014). "Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits". Food Chemistry **156**: 362-368.

Rivadeneira, M. y Kirschbaum, D. (2012). "Inta-programa nacional frutales-cadena arándano". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. [en línea]: <https://inta.gob.ar/documentos/cadena-arandano-en-argentina>: 8.

Rivera-Pastrana, D. M., Gardea Béjar, A. A., Martínez-Téllez, M. Á., Rivera-Domínguez, M. y González-Aguilar, G. A. (2007). "Efectos bioquímicos poscosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas". *Revista Fitotecnia Mexicana* **30**(4): 361-372.

Rivera, S. A., Zoffoli, J. P. y Latorre, B. A. (2013). "Determination of optimal sulfur dioxide time and concentration product for postharvest control of gray mold of blueberry fruit". *Postharvest Biology and Technology* **83**: 40-46.

Rodoni, L., Casadei, N., Concellón, A., Chaves Alicia, A. R. y Vicente, A. R. (2010). "Effect of short-term ozone treatments on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**(1): 594-599.

Romero, C. (2016). "El Arándano en el Perú y el Mundo". *Ministerio de Agricultura y Riego* **1**: 1-42.

Rose, J. K. C. y Bennett, A. B. (1999). "Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening". *Trends in Plant Science* **4**(5): 176-183.

Routray, W. y Orsat, V. (2011). "Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**(6): 303-320.

Rubio, J. C. G., de Lena, G. G. G. y Ara, M. C. (2013). "Situación actual del cultivo del arándano en el mundo". *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*(12): 5-8.

Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. y Langebartels, C. (1998). "Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions". *Trends in Plant Science* **3**(2): 47-50.

Sapers, G. M. y Phillips, J. G. (1985). "Leakage of Anthocyanins from Skin of Raw and Cooked Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)". *Journal of Food Science* **50**(2): 437-439.

Sari, L. K., Setha, S. y Naradisorn, M. (2016). "Effect of UV-C irradiation on postharvest quality of 'Phulae' pineapple". *Scientia Horticulturae* **213**: 314-320.

- Schenk, M., Guerrero, S. y Alzamora, S. (2007). "Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear". *Food and Bioprocess Technology* **1**: 384-392.
- Schreiber, L. y Schonherr, J. (2009). *Water and solute permeability of plant cuticles*. Berlin, Alemania: Springer **Cap. 4**: 61-122.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S. y Heber, D. (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(25): 9329-9339.
- Selma, M. V., Allende, A., López-Gálvez, F., Conesa, M. A. y Gil, M. I. (2008). "Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry". *Food Microbiology* **25**(6): 809-814.
- Selma, M. V., Beltrán, D., Allende, A., Chacón-Vera, E. y Gil, M. I. (2007). "Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water". *Food Microbiology* **24**(5): 492-499.
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. "Informes y estadísticas. exportaciones / importaciones - frutas - año 2017 [en línea]: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/informacion/informes-y-estadisticas>." Ingreso: 14-Dic, 2018.
- Seymour, G. B., Taylor, J. E. y Tucker, G. A. (2012). *Biochemistry of fruit ripening*. UK: Springer Science y Business Media.
- Shama, G. (2006). Ultraviolet light. En: Hui, Y.H.(Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Florida, Taylor & Francis. **vol. 3**: pp. 122-121–122-114.
- Shama, G. y Alderson, P. (2005). "UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation". *Trends in Food Science and Technology* **16**(4): 128-136.
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R. y Doucette, C. (2009). "Effects of ozone treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to horticultural product quality". *Journal of Food Science* **74**(6): M250-M257.

- Silveira, A. C., Oyarzún, D. y Escalona, V. (2018). "Oxidative enzymes and functional quality of minimally processed grape berries sanitised with ozonated water". *International Journal of Food Science y Technology* **53**(6): 1371-1380.
- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I. y Casiraghi, E. (2008). "Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy". *Postharvest Biology and Technology* **50**(1): 31-36.
- Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K. y Stroshine, R. L. (2002). "Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce". *Food Microbiology* **19**(2): 183-193.
- Skurtys, O., Velásquez, P., Henriquez, O., Matiacevich, S., Enrione, J. y Osorio, F. (2011). "Wetting behavior of chitosan solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes". *LWT - Food Science and Technology* **44**(6): 1449-1457.
- Slinkard, K. y Singleton, V. L. (1977). "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods". *American Journal of Enology and Viticulture* **28**(1): 49-55.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. M. y Mlikota Gabler, F. (2002). "Impact of ozonated water on the quality and shelf-life of fresh citrus fruit, stone fruit, and table grapes". *Ozone: Science y Engineering* **24**(5): 343-356.
- Song, H.-J., Choi, D.-W. y Song, K. B. (2011). "Effect of aqueous chlorine dioxide and UV-C treatment on the microbial reduction and color of cherry tomatoes". *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **52**(5): 488.
- Song, J., Fan, L., Forney, C. F., Jordan, M. A., Hildebrand, P. D., Kalt, W. y Ryan, D. A. J. (2003). "Effect of ozone treatment and controlled atmosphere storage on quality and phytochemicals in highbush blueberries". *International Society for Horticultural Science (ISHS)*: 417-423.
- Steenkamp, J.-B. E. (1990). "Conceptual model of the quality perception process". *Journal of Business research* **21**(4): 309-333.

Suzuki, M., Nakabayashi, R., Ogata, Y., Sakurai, N., Tokimatsu, T., Goto, S., Suzuki, M., Jasinski, M., Martinoia, E., Otagaki, S., Matsumoto, S., Saito, K. y Shiratake, K. (2015). "Multiomics in grape berry skin revealed specific induction of the stilbene synthetic pathway by Ultraviolet-C irradiation". *Plant Physiology* **168**(1): 47.

Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L. y Báez-Sañudo, R. (2013). "Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas". *Revista Fitotecnia Mexicana* **36**(1): 3-12.

Teo, K. C., Yang, C., Xie, R. J., Goh, N. K. y Chia, L. S. (2003). "Destruction of model organic pollutants in water using ozone, UV and their combination (Part I)". *Water Science and Technology* **47**(1): 191-196.

Terao, D., de Carvalho Campos, J. S., Benato, E. A. y Hashimoto, J. M. (2015). "Alternative strategy on control of postharvest diseases of mango (*Mangifera indica* L.) by use of low dose of Ultraviolet-C irradiation". *Food Engineering Reviews* **7**(2): 171-175.

Tiecher, A., de Paula, L. A., Chaves, F. C. y Rombaldi, C. V. (2013). "UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening". *Postharvest Biology and Technology* **86**: 230-239.

Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K. y Cullen, P. J. (2009). "Anthocyanin and colour degradation in ozone treated blackberry juice". *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **10**(1): 70-75.

Tzortzakis, N., Borland, A., Singleton, I. y Barnes, J. (2007). "Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit". *Postharvest Biology and Technology* **45**(3): 317-325.

Tzortzakis, N. y Chrysargyris, A. (2017). "Postharvest ozone application for the preservation of fruits and vegetables". *Food Reviews International* **33**(3): 270-315.

Undurraga, P. y Vargas, S. (2013). "Manual del arándano". Obtenido de Instituto de investigaciones agropecuarias Chillan Chile. [en línea]: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf>.

Vásquez Mazo, P. (2015). Efecto de la combinación de luz ultravioleta y temperatura en el procesamiento de leche y derivados., Tesis Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Vicente, A., Mangaris, G., Sozzi, G. y Crisosto, C. (2009). Nutritional quality of fruits and vegetables. . En: Florkowski, W., Shewfelt, R., Brueckner, B., Prussia, S. Postharvest Handling: A Systems Approach. EEUU.: Elsevier. **Cap. 5:** 58-106.

Vicente, A. R., Ortugno, C., Rosli, H., Powell, A. L. T., Greve, L. C. y Labavitch, J. M. (2007). "Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 2. analysis of blueberry (*Vaccinium* species)". Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(10): 4125-4130.

Vicente, A. R., Pineda, C., Lemoine, L., Civello, P. M., Martinez, G. A. y Chaves, A. R. (2005). "UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper". Postharvest Biology and Technology **35**(1): 69-78.

Viñas, I., Recasens, I., Usall, J. y Graell, J. (2013). Poscosecha de pera, manzana y melocotón. Madrid, España.: Mundi-Prensa Libros.

Waldron, K. W., Smith, A. C., Parr, A. J., Ng, A. y Parker, M. L. (1997). "New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture". Trends in Food Science y Technology **8**(7): 213-221.

Wang, C. Y., Chen, C.-T. y Wang, S. Y. (2009). "Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C". Food Chemistry **117**(3): 426-431.

Wang, Y., Hollingsworth, R. I. y Kasper, D. L. (1999). "Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution". Carbohydrate Research **319**(1-4): 141-147.

Wright, H. y Cairns, W. (1998). "Ultraviolet light". En: Regional Symposium on Water Quality: Effective Disinfection: pág. 1-26. CEPIS.

Xu, F. y Liu, S. (2017). "Control of postharvest quality in blueberry fruit by combined 1-methylcyclopropene (1-MCP) and UV-C irradiation". Food and Bioprocess Technology **10**(9): 1695-1703.

Xu, F., Wang, S., Xu, J., Liu, S. y Li, G. (2016). "Effects of combined aqueous chlorine dioxide and UV-C on shelf-life quality of blueberries". *Postharvest Biology and Technology* **117**: 125-131.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A. y Bagchi, D. (2007). "Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention". *Molecular Nutrition and Food Research* **51**(6): 675-683.

Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente, G. y Cárcel, J. A. (2014). "Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos". *Ciencia Docencia y Tecnología* **25**(49): 166-192.